

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**

**FACULTAD DE MEDICINA**

**DEPARTAMENTO DE MEDICINA**



**TESIS DOCTORAL**

**Evaluación de biomarcadores serológicos de candidiasis  
invasiva para su aplicación clínica**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTORA

PRESENTADA POR

**María del Carmen Martínez Jiménez**

DIRECTORES

**Emilio Bouza Santiago  
Patricia Muñoz García**

Madrid, 2017

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**

**FACULTAD DE MEDICINA**

**DPTO. MEDICINA**



**EVALUACIÓN DE BIOMARCADORES SEROLÓGICOS DE CANDIDIASIS  
INVASIVA PARA SU APLICACIÓN CLÍNICA**

**MARÍA DEL CARMEN MARTÍNEZ JIMÉNEZ**

**DIRECTORES:**

D. EMILIO BOUZA SANTIAGO

Da. PATRICIA MUÑOZ GARCÍA

**MADRID 2015**

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**

**FACULTAD DE MEDICINA**

**TESIS DOCTORAL**

**EVALUACIÓN DE BIOMARCADORES SEROLÓGICOS DE CANDIDIASIS INVASIVA PARA SU  
APLICACIÓN CLÍNICA**



**DOCTORANDO**

MARÍA DEL CARMEN MARTÍNEZ JIMÉNEZ

**DIRECTORES DE TESIS**

DR. EMILIO BOUZA SANTIAGO

DRA. PATRICIA MUÑOZ GARCÍA

MADRID, 2015



El Profesor D. Emilio Bouza Santiago, Jefe del Servicio de Microbiología Clínica y Enfermedades Infecciosas del Hospital General Universitario Gregorio Marañón y Catedrático de Microbiología de la Universidad Complutense de Madrid y la doctora D<sup>a</sup> Patricia Muñoz García Jefe de Sección del Servicio de Microbiología Clínica y Enfermedades Infecciosas del Hospital General Universitario Gregorio Marañón y Profesora Titular de Microbiología de la Universidad Complutense de Madrid

CERTIFICAN:

Que el trabajo titulado” *Evaluación de biomarcadores serológicos de candidiasis invasiva para su aplicación clínica*” ha sido llevado a cabo bajo su dirección por Dña. María del Carmen Martínez Jiménez, y reúne las condiciones exigibles para ser presentado como tesis para aspirar a la obtención del título de Doctor por la Universidad Complutense de Madrid.

Para que conste y surta los efectos oportunos, firman el presente certificado a

Madrid\_\_\_\_\_de\_\_\_\_\_del 2015

Prof. D. Emilio Bouza Santiago  
Director de la tesis

Prof. D<sup>a</sup> Patricia Muñoz García  
Directora de tesis

# **DEDICATORIA**

A mis padres y mis hermanos con todo el más merecido cariño del mundo

# AGRADECIMIENTOS

A Dios por suscitarme la vocación de servicio.

Al doctor Emilio Bouza por el cual siento una gran admiración y respeto; por su gran profesionalidad y espíritu de sacrificio.

A la doctora Patricia Muñoz por su manera de quitarle importancia a las cosas que realmente no la tienen, por su perseverancia, dedicación y amistad.

A ambos les agradezco inmensamente el brindarme la oportunidad de hacer la tesis en su servicio y por dirigirme mi trabajo en esta etapa tan dura de mi vida profesional.

Al doctor Jesús Guinea por sus enseñanzas, apoyo y consejos; por tanto tiempo que, de manera totalmente altruista, me ha prestado y por su amistad. Gracias Jesús, porque sin ti habría tirado la toalla innumerables veces. Gracias también a Pilar Escribano y a Laura Martos por ser tan geniales.

Gracias a Maricela por todos sus clases magistrales y sus ánimos.

Al doctor Buenaventura Buendía, por introducirme en el inexplorado mundo de la micología y su apoyo incondicional tanto durante la residencia como fuera de ella; y a la doctora Laura Cardeñoso por su apoyo y cariño.

Al doctor Luis Alcalá, por sus consejos y enseñanzas en el arduo mundo de la estadística.

A los doctores Javier Pemán, Cristóbal León, Rafael Zaragoza, Josep Cano, Josep Guarro, Beto Stchigel y Josepa Gené y todos los colegas y amigos de Reus, Dea García Hermoso, Guillermo Quindós, Lola Moragues por su cariño, amistad y su gran profesionalidad.



A todos los micólogos de España, grupo pequeño pero muy bien avenido, por su gran profesionalidad, humanidad y amistad, y por todos los cuales siempre estoy deseosa de asistir a cualquier reunión de micología.

A todos mis compañeros del Hospital Gregorio Marañón y de la Princesa por su cariño en los momentos más duros de la tesis.

Y a todos los que guardo en mi corazón. Seguro que eres tú...GRACIAS.

“Qué Dios os bendiga”

# ÍNDICE

<b>SUMMARY</b>	<b>I</b>
<b>RESUMEN EN ESPAÑOL</b>	<b>II</b>
<b>INTRODUCCIÓN</b>	<b>29</b>
<b>1. ASPECTOS BÁSICOS DEL GÉNERO <i>CANDIDA</i></b>	<b>30</b>
1.1 DESCRIPCIÓN TAXONÓMICA DEL GÉNERO <i>CANDIDA</i>	31
1.2 ESPECIES DE <i>CANDIDA</i> CONOCIDAS	31
1.3 METODOS DE IDENTIFICACIÓN DE LABORATORIO	32
1.4 BREVE DESCRIPCIÓN DE LA FISIOLÓGÍA DE LOS HONGOS	33
1.5 ESTADÍOS DE LA INFECCIÓN POR <i>CANDIDA</i> SPP	38
<b>2. CANDIDIASIS INVASORA. EPIDEMIOLOGÍA</b>	<b>42</b>
2.1 ORIGEN DE LA CANDIDIASIS: ENDÓGENO FRENTE A EXÓGENO	43
2.2 TIPOS DE CANDIDIASIS INVASIVA	44
2.3 EPIDEMIOLOGÍA: INCIDENCIA GEOGRÁFICA DE LA CANDIDIASIS	46
2.4 EPIDEMIOLOGÍA: POBLACIONES AFECTADAS.	48
2.5 EPIDEMIOLOGÍA: DISTRIBUCIÓN DE LAS ESPECIES DE <i>CANDIDA</i>	55
2.6 EPIDEMIOLOGÍA: RESISTENCIA A ANTIFÚNGICOS	58
<b>3. EL PROBLEMA DIAGNÓSTICO</b>	<b>61</b>
3.1 EL PROBLEMA CLÍNICO	62
3.2 EL PROBLEMA MICROBIOLÓGICO	67
<b>4. EL PROBLEMA TERAPÉUTICO</b>	<b>68</b>
4.1 EL ANTIFÚNGICO	69
4.2 EL MAL USO DEL ANTIFÚNGICO	75
4.3 CONSECUENCIAS DEL MAL USO DE ANTIFÚNGICOS	78
<b>5. BIOMARCADORES: ALTERNATIVAS DIAGNÓSTICAS</b>	<b>83</b>
QUÉ ES UN BIOMARCADOR.	84
CUÁL ES EL BIOMARCADOR IDEAL	84
GENERACIONES DE BIOMARCADORES	85

DIANAS DE LOS DIFERENTES BIOMARCADORES: ¿LA CLAVE ESTÁ EN LA PARED CELULAR DE CANDIDA SPP?	87
BIOMARCADORES BASADOS EN ANTÍGENOS	88
BIOMARCADORES BASADOS EN ANTICUERPOS	91
BIOMARCADORES BASADOS EN LA BÚSQUEDA DE ÁCIDOS NUCLEICOS	95
PROTEÓMICA COMO HERRAMIENTAS DIAGNÓSTICA DE LA INFECCIÓN FÚNGICA	97
<b>6. PROGRAMAS DE ANTIFUNGAL STEWARDSHIP</b>	<b>99</b>
PRIMERA GENERACIÓN DE LOS PROGRAMAS DE AFS: ¿QUÉ SE HA LOGRADO HASTA AHORA?	101
SEGUNDA GENERACIÓN DE LOS PROGRAMAS DE AFS. ¿HASTA DÓNDE PODEMOS LLEGAR?.	102
<b>7. ¿EN QUÉ PUNTO ESTAMOS? ¿CUÁLES SON LAS EXPECTATIVAS FUTURAS?</b>	<b>105</b>
<b>8. CARENCIAS DE LA LITERATURA</b>	<b>108</b>
<b>OBJETIVOS</b>	<b>111</b>
<b>OBJETIVO PRINCIPAL</b>	<b>112</b>
<b>OBJETIVOS ESPECÍFICOS</b>	<b>112</b>
<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b>	<b>113</b>
<b>DISEÑO DE LOS ESTUDIOS</b>	<b>114</b>
RETROSPECTIVO	114
PROSPECTIVO	114
<b>DESCRIPCIÓN DEL HOSPITAL</b>	<b>115</b>
<b>TIPO DE PACIENTE</b>	<b>115</b>
<b>TIPO DE MUESTRA</b>	<b>115</b>
<b>DEFINICIONES</b>	<b>116</b>
<b>TIPO DE CANDIDIASIS INVASIVA</b>	<b>117</b>
CANDIDIASIS INVASIVA SIN CANDIDEMIA	117
CANDIDIASIS INVASIVA CON CANDIDEMIA	117
CANDIDEMIA PRIMARIA/ CANDIDEMIA RELACIONADA CON EL CATÉTER	117
BIOMARCADORES EVALUADOS	118
DETERMINACIÓN SEROLÓGICA DE <i>CANDIDA ALBICANS</i> GERM TUBE ANTIBODY (CAGTA).	118

DETERMINACIÓN SEROLÓGICA DE LOS ANTÍGENOS MANANO (MN) Y ANTICUERPOS ANTI-MANANOS (AMN).	118
DETERMINACIÓN SEROLÓGICA DE (1-3)-BETA-D-GLUCAN (BDG).	119
<b>RECOGIDA DE DATOS</b>	<b>119</b>
<b>ANÁLISIS ESTADÍSTICO</b>	<b>119</b>
<b>ASPECTOS ÉTICOS Y LEGALES</b>	<b>120</b>
ESTUDIOS RETROSPECTIVOS	120
ESTUDIO PROSPECTIVO	120
<b>RESULTADOS</b>	<b>122</b>
<b>OBJETIVO 1</b>	<b>124</b>
<b><u>EVALUAR SI LA DETERMINACIÓN DEL <i>CANDIDA ALBICANS</i> GERM TUBE ANTIBODY (CAGTA) ES CAPAZ DE DISCRIMINAR EL ORIGEN DE LA CANDIDEMIA</u></b>	<b>124</b>
INTRODUCCIÓN	125
MATERIALES Y MÉTODOS	126
RESULTADOS	127
DISCUSIÓN	132
CONCLUSIONES	136
LIMITACIONES	136
<b>OBJETIVO 2</b>	<b>137</b>
<b><u>MEJORAR EL PODER DIAGNÓSTICO DE LOS BIOMARCADORES DE CANDIDIASIS INVASIVA MEDIANTE SU COMBINACIÓN Y EL ANÁLISIS DE CUT-OFFS ALTERNATIVOS EN PACIENTES CON CANDIDEMIA Y BACTERIEMIA PARA LA EXCLUSIÓN DE LA CANDIDEMIA.</u></b>	<b>137</b>
INTRODUCCIÓN	138
MATERIALES Y MÉTODOS	140
PACIENTES INCLUIDOS Y MUESTRAS ESTUDIADAS.	140
DETECCIÓN SEROLÓGICA DE LOS BIOMARCADORES	140
ANÁLISIS DE DATOS	141
<b>RESULTADOS</b>	<b>142</b>
CARACTERÍSTICAS DE LOS PACIENTES	142
RESULTADOS DE CAGTA, MN / AMN, Y BDG INDIVIDUALMENTE.	145

RESULTADOS DE CAGTA, MN, AMN, Y BDG USADOS EN COMBINACIÓN	148
EFFECTO DE <i>CANDIDA</i> SPP CAUSANTES DE CANDIDEMIA SOBRE EL RESULTADO DE LOS BIOMARCADORES.	150
<b>DISCUSIÓN</b>	<b>153</b>
<b>CONCLUSIONES</b>	<b>157</b>
<b>LIMITACIONES</b>	<b>157</b>
<b>OBJETIVO 3</b>	<b>158</b>
<b><u>ANÁLISIS DEL PAPEL POTENCIAL DE LA DETERMINACIÓN SERIADA DE CAGTA Y BDG EN PACIENTES CON TRATAMIENTO ANTIFÚNGICO EMPÍRICO POR SOSPECHA DE CANDIDIASIS INVASIVA PARA LA RETIRADA PRECOZ DEL TRATAMIENTO ANTIFÚNGICO INNECESARIO</u></b>	<b><u>158</u></b>
<b>INTRODUCCIÓN</b>	<b>159</b>
<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b>	<b>160</b>
DEFINICIONES	162
MÉTODOS MICROBIOLÓGICOS	163
ANÁLISIS DE DATOS	164
CONSIDERACIONES ÉTICAS	165
<b>RESULTADOS</b>	<b>166</b>
<b>DISCUSIÓN</b>	<b>175</b>
<b>AGRADECIMIENTOS</b>	<b>182</b>
<b>CONCLUSIONES</b>	<b>184</b>
<b><u>REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS</u></b>	<b><u>187</u></b>
<b><u>ANEXOS</u></b>	<b><u>206</u></b>
<b>PUBLICACIONES</b>	<b>209</b>
ESTUDIO 1	209
ESTUDIO 2	210
ESTUDIO 3	211

# SUMMARY

# Evaluation of the clinical value of serological biomarkers of invasive candidiasis

## INTRODUCTION

Delayed diagnosis of invasive candidiasis has been demonstrated to have a significant impact on the mortality and cost of this infection. Several clinical predictive “scores” have been proposed in order to facilitate the indication of empirical antifungal therapy in high-risk patients. Unfortunately, the positive predictive value of these “scores” is very low and its widespread application has led to a significant overuse of antifungal drugs. The consequences of this practice include unnecessary toxicity, drug interactions, changes in the epidemiology and resistance pattern of *Candida* infection and a huge increase in the cost.

This strategy can be modified by the application of Antifungal Stewardship Programs (ASP). An ASP based on a bundle of measures and on the bedside advice of experts with wide clinical expertise has been able to reduce 250,000- 370,000 € per year in antifungals in our hospital, without impairing the quality of patient care, nor increasing mortality [1-3]. However, this experience showed us that better microbiological diagnostic tools were needed in order to be able of stopping empirical therapy with enough confidence in many of our high-risk patients.

Culture-independent diagnostic techniques emerged as very promising tools for the early diagnosis of invasive candidiasis. However, available data showed that when used alone, most of these biomarkers had too low sensitivity to be useful in an AFS program. Besides, the large number of false positives could also contribute to even enlarge the overuse of antifungal drugs.

We noticed that the combination of different biomarkers had not been adequately evaluated for the exclusion of invasive candidiasis as complementary tools in ASP.

## OBJECTIVES

### MAIN OBJECTIVE

To evaluate the clinical value of serological biomarkers of invasive candidiasis - *Candida albicans* germ tube antibody (CAGTA), mannan antigens (MN), antimannan antibodies (AMN) and (1,3)- $\beta$ -D-glucan (BDG).

### SPECIFIC OBJECTIVES

Each objective represents an independent study whose methods and results are summarized below:

#### STUDY 1

##### **Objective:**

To evaluate the role of CAGTA in the discrimination of the origin of candidaemia.

##### **Material and methods:**

We studied stored serum samples from 50 patients with candidemia diagnosed from 2003 to 2012. Patients were classified according to the candidemia origin in deep-seated candidiasis and non-deep-seated candidiasis. *Candida albicans* germ tube antibody (CAGTA) was determinate according to the manufacturer's recommendations (Vircell Microbiologist S.L., Granada, Spain) and compared in both groups.

##### **Results:**

Overall, 29 patients had deep-seated candidiasis and 21 non-deep-seated candidiasis (catheter-related candidemias). Most common species were *Candida*



*albicans*, 40%; *Candida tropicalis*, 20%; *Candida parapsilosis*, 18%; and *Candida glabrata*, 12%. CAGTA was positive in 1/21 non-deep-seated candidemias (DSCs; 4.76%) and in 20/29 DSCs (68.96%;  $P < 0.01$ ). Accordingly, the specificity and positive predictive values of CAGTA for identifying DSC were 95%.

## STUDY 2

### Objective

To optimize the use of biomarkers of invasive candidiasis for excluding candidemia by analyzing different combinations and alternative cut-offs.

### Material and methods

We studied stored serum samples from 31 patients with candidemia (*Candida albicans* 40%, *Candida tropicalis* 20%, *Candida parapsilosis* 18%, *Candida glabrata* 12% and others 10%) and 50 patients with bacteremia at Gregorio Marañón Hospital, Madrid, Spain. *Candida albicans* germ tube antibody (CAGTA), mannan antigens (MN), antimannan antibodies (AMN) and (1,3)- $\beta$ -D-glucan (BDG) were assayed using the manufacturer's and alternative cut-offs to improve the accuracy of the tests.

### Results

The sensitivity of the biomarkers when used alone was low (58%-84%), but specificity was moderate-high (65.8%-92.0%). The best combinations were CAGTA and BDG using cut-offs of 1/80 and 80 pg/mL, respectively (sensitivity 96.8% and specificity 84%), and CAGTA and MN using cut-offs of 1/80 and 75 pg/mL, respectively (sensitivity 93.5% and specificity 86.0%). The sensitivity of both combinations was 100% for infections caused by *Candida albicans*, *Candida tropicalis* and *Candida parapsilosis*, but only

combinations including BDG detected *Candida krusei*. The negative predictive values (NPVs) of both combinations were, respectively, 97.7% and 95.6% (prevalence of candidaemia, 23.6%). For a prevalence of candidaemia of 5% and 10%, the NPV reached 99.8% and 99.6%.

### STUDY 3

#### Objective

To analyze the potential role of serial determinations of CAGTA and BDG in patients receiving empirical antifungal treatment for suspected invasive candidiasis in the early withdrawal of unnecessary antifungals.

#### Material and methods

Prospective observational study, from 2012 to 2014, including adults starting empiric antifungal treatment for suspected IC, at Gregorio Marañón Hospital, Madrid, Spain. Patients were stratified according to admission department (ICU or other wards) and final diagnosis (no IC or proven or probable IC). Type of candidiasis (candidemia or deep-seated candidiasis) was also considered. *Candida albicans* germ tube antibody test (CAGTA) and (1,3)- $\beta$ -D-glucan test (BDG) were performed on serum samples collected by venipuncture on days 0, +3, and +5.

#### Results

63 ICU and 37 non-ICU patients were included. High-risk gastrointestinal surgery and sepsis in non-surgical patients were the main indications for empirical treatment (30% each). Patients had non-IC (58%), proven IC (30%), or probable IC (12%). Sensitivity and negative predictive value of CAGTA and BDG were 97% for the combination on days 0,

+3, and +5 for the overall population. The best performance was observed in ICU patients (sensitivity and negative predictive value of 100%).

## CONCLUSIONS

1. In our experience, 42% of patients with candidemia have catheter-related candidemia and primary candidemia and the remaining 58% are due to deep infections, mainly associated with intra-abdominal infections and urinary tract infection.

2. In candidemic patients, the presence of a positive CAGTA test in a serum sample suggests deep-seated candidiasis.

3. The sensitivity of the anti-mycelium antibodies (CAGTA) test for candidemia, although designed for *Candida albicans* is also high with other *Candida* species, with the exception of *Candida tropicalis* (30%).

4. For detection of candidemia, the determination of (CAGTA), of (1,3) -beta-D-glucan, and mannan antigens (MN) and anti-mannan antibodies (AMN) alone are not ideal (sensitivity ranges from 51.6% to 83.9%). However, the sensitivity of the combination of CAGTA and BDG or of CAGTA and MN for diagnosing candidemia was 97%.

5. In septic patients, the combination of CAGTA and BDG and CAGTA and MN, showed a very high negative predictive value (> 99%) for the presence of candidemia. We recommend the use of CAGTA and BDG combination with the cut-offs of 1/80 and 80 pg / mL, respectively, as usual test for the exclusion of candidemia and invasive candidiasis.

6. Invasive candidiasis was proven only in 30% of all patients receiving empirical antifungal therapy. It is more prevalent in non-ICU patients (56.7%) than among ICU patients (14.3%).

7. The different indications for empirical antifungal prescriptions were high risk abdominal surgery and sepsis in non-surgical patients. Echinocandins accounted for 73% of treatments (84% in ICU and 54% in other departments) and was maintained for an average of 10 days.

8. In patients with suspected invasive candidiasis in which empirical antifungal treatment is started, the serial determination of the combination CAGTA and BDG in the first five days yielded a high negative predictive value, reaching 100% in patients admitted to the ICU.

9. The strategy of the serial determination of the combination CAGTA and BDG in the first five days of treatment would allow a safe removal of empirical antifungal drugs in a third of patients.

10. The strategy of the serial determination of CAGTA and BDG in combination would be useful as a complementary tool in the Antifungal Stewardship programs.

# RESUMEN EN ESPAÑOL

## ***“Evaluación de biomarcadores serológicos de candidiasis invasiva para su aplicación clínica”***

### **INTRODUCCIÓN**

El retraso diagnóstico de la candidiasis invasiva es un problema por la alta mortalidad de esta infección. Los “scores” predictivos utilizados habitualmente para identificar a aquellos pacientes que desarrollarán candidiasis invasiva selecciona una gran cohorte de pacientes de alto riesgo, de los cuales muchos de ellos jamás desarrollarán la infección.

La aplicación de estos “scores” clínicos implica un sobreuso de antifúngicos, lo cual tiene consecuencias para el paciente, para el gasto hospitalario, y para la epidemiología de la candidiasis invasiva. Estas consecuencias pueden ser modificadas mediante la aplicación de programas de Antifungal Stewardship en el hospital. En una primera generación de antifungal stewardship se ha reducido entre 250.000 € y 370.000 € por año en un hospital terciario a través de recomendaciones y auditorías sobre el uso de antifúngicos, sin menoscabar la calidad asistencial del pacientes ni aumentar la mortalidad. Sin embargo, la solución al sobreuso de antifúngicos solo es parcial, y los clínicos no tienen la suficiente confianza para retirar tratamientos antifúngicos en pacientes de alto riesgo.

El desarrollo de las técnicas diagnósticas independientes de cultivo ha emergido como herramientas prometedoras para el diagnóstico precoz de la candidiasis invasiva. Sin embargo, en este contexto hay muchas limitaciones, principalmente relacionadas con su baja rentabilidad cuando se usan de manera

individual y por el gran número de falso positivos que presentan contribuyendo también, por su parte, al sobreuso de antifúngicos

Sin embargo, los biomarcadores de candidiasis invasiva todavía no han sido evaluados adecuadamente como herramientas de exclusión de candidiasis invasiva ni como complementarias en los programas de antifungal stewardship.

## OBJETIVOS

### OBJETIVO PRINCIPAL

Evaluar la utilidad de los biomarcadores serológicos de candidiasis invasiva, *Candida albicans* germ tube antibody (CAGTA), antígenos mananos (MN), anticuerpos antimananos (AMN) y (1,3)- $\beta$ -D-glucano (BDG), para su aplicación clínica.

### OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Cada objetivo representa un estudio independiente cuyos métodos y resultados se resumen a continuación:

#### ESTUDIO 1

##### Objetivo:

Evaluar el papel de CAGTA en la discriminación del origen de la candidemia.

##### Materiales y métodos:

Analizamos retrospectivamente sueros conservados en seroteca de 50 pacientes con diagnóstico de candidemia en los periodos entre 2003-2012. Los pacientes fueron clasificados según el origen de la candidemia en candidemia con candidiasis invasiva asociada (DSC) y candidemia sin candidiasis invasiva asociada (no-DSC). *Candida albicans* germ tube antibody (CAGTA) fue determinado siguiendo las instrucciones del fabricante (Vircell Microbiologist S.L., Granada, Spain) y ambos grupos de pacientes fueron comparados.

**Resultados:**

29 pacientes fueron clasificados como DSC y 21 como no-DSC. Las principales especies de *Candida* aisladas en sangre de los pacientes con candidemia fueron *Candida albicans*, 40%; *Candida tropicalis*, 20%; *Candida parapsilosis*, 18%; y *Candida glabrata*, 12%. En el procesamiento de las muestras de suero, CAGTA fue positivo en 1/21 candidemias sin candidiasis invasiva asociada (no-DSC; 4,76%) y en 20/29 candidemias con candidiasis invasiva (DSCs, 68,96%;  $P < 0.01$ ). Acordadamente, los valores de especificidad y valor predictivo positivo de CAGTA para identificar a los pacientes con candidemia con candidiasis invasiva fueron del 95%.



## ESTUDIO 2

### Objetivo

Optimizar el uso de los biomarcadores de candidiasis invasiva, mediante su combinación y mediante el análisis de cut-offs alternativos para la exclusión de candidemia.

### Materiales y métodos

Retrospectivamente se estudiaron muestras de suero archivadas de 31 pacientes con diagnóstico de candidemia (*Candida albicans* 40%, *Candida tropicalis* 20%, *Candida parapsilosis* 18%, *Candida glabrata* 12% y otras especies de *Candida* 10%) y 50 pacientes con diagnóstico de bacteremia que estuvieron ingresados en el Hospital Gregorio Marañón, Madrid, España. Fueron testados *Candida albicans* germ tube antibody (CAGTA), antígenos mananos (MN), anticuerpos antimananos (AMN) y (1,3)- $\beta$ -D-glucano (BDG) según los cut-offs de los fabricantes y cut-offs alternativos, para mejorar la precisión de los tests.

### Resultados

La sensibilidad de los biomarcadores cuando se analizaron individualmente fue baja (58%-84%), pero la especificidad fue alta (65,8%-92,0%). Las mejores combinaciones fueron CAGTA y BDG para los cut-offs de 1/80 y 80 pg/mL, respectivamente (sensibilidad 96,8% y especificidad 84%), y CAGTA y MN para los cut-offs de 1/80 y 75 pg/mL, respectivamente (sensibilidad 93,5% y especificidad 86,0%). La sensibilidad de ambas combinaciones fue del 100% para *Candida albicans*, *Candida tropicalis* y *Candida parapsilosis*, pero solo las combinaciones que incluyeron BDG fueron capaces de detectar *Candida krusei*. Los VPN de ambas combinaciones fueron,

respectivamente, 97,7% and 95,6% (prevalencia de candidemia, 23,6%). Para las prevalencias de candidemia del 5% y del 10%, los VPN fueron 99,8% y 99,6%, respectivamente.

### ESTUDIO 3

#### Objetivo

Analizar el papel potencial de las determinaciones seriadas de CAGTA y BDG en pacientes con tratamiento antifúngico empírico por sospecha de candidiasis invasiva para la retirada de antifúngicos innecesarios.

#### Materiales y métodos

Estudio prospectivo observacional llevado a cabo desde 2012 a 2014, que incluyó pacientes adultos ingresados en el Hospital Gregorio Marañón, Madrid, España, que iniciaron tratamiento antifúngico empírico por sospecha de candidiasis invasiva. Los pacientes fueron estratificados según el servicio de ingreso (ICU u otros servicios) y el diagnóstico final de candidiasis invasiva (sin CI o CI probada o CI probable). El tipo de candidiasis (candidemia con o sin candidiasis invasiva) también fue considerado. *Candida albicans* germ tube antibody (CAGTA) y (1,3)- $\beta$ -D-glucano (BDG) fueron determinados en sueros recogidos por punción venosa en los días 0, +3, y +5 de iniciado el tratamiento antifúngico.

#### Resultados

Se incluyeron 63 pacientes ingresados en la UCI y 37 ingresados en otros servicios (no-UCI). Las principales indicaciones para la prescripción del tratamiento antifúngico empírico fueron los pacientes con cirugía gastrointestinal de alto riesgo y la sepsis en pacientes no quirúrgicos (30% cada uno). El 58% de los pacientes no tuvo CI frente a el

30% de CI probada y el 12% de CI probable. Para la población de estudio en general, la sensibilidad y el VPN de CAGTA y BDG fue del 97% para la combinación de los días 0, +3, and +5, considerando que al menos una sola de las determinaciones fuera positiva. Los mejores resultados fueron observados en los pacientes ingresados en la UCI (sensibilidad y VPN del 100%).

## CONCLUSIONES

1. En nuestra experiencia, el 42% de los pacientes con candidemia tuvieron candidemia relacionada con el catéter y candidemia primaria, y el restante 58% de las candidemias fueron debidas a infecciones profundas, principalmente las asociadas a infecciones intraabdominales y a infecciones del tracto urinario.

2. En pacientes con candidemia, la presencia de anticuerpos antimicelio (CAGTA positivo) frente a *Candida* en muestras de suero sugiere candidiasis invasiva con infección de órganos y tejidos profundos.

3. La sensibilidad del test de los anticuerpo antimicelio (CAGTA) para la detección de candidemia, aunque fue diseñado para *Candida albicans* también es alta para otras especies de *Candida*, con la excepción de *Candida tropicalis* (30%).

4. Para el diagnóstico de candidemia, la determinación de los tests anticuerpos antimicelio (CAGTA), (1,3)-beta-D-glucano (BDG), antígeno manano (MN) y anticuerpos antimanano (AMN) de forma individual no son los ideales (sensibilidades se encuentran entre 51.6% y 83.9%). Sin embargo, la sensibilidad de la combinación CAGTA y BDG o CAGTA y MN para el diagnóstico de candidemia fue del 97%.

5. En pacientes sépticos, la combinación de CAGTA y BDG y de CAGTA y MN, mostraron un elevado valor predictivo negativo (>99%) para el diagnóstico de candidemia. Dado que únicamente las combinaciones que contuvieron BDG en su fórmula fueron capaces de detectar todas las especies de *Candida*, recomendamos el uso de la combinación CAGTA y BDG, con los puntos de corte de 1/80 y 80 pg/mL, respectivamente, como tests habituales para la exclusión de candidemia y de candidiasis invasiva.

6. La candidiasis invasiva sólo fue probada en el 30% de los pacientes que recibieron tratamiento antifúngico empírico. Esta es más prevalente en los pacientes no-UCI (56.7%) que entre los pacientes de UCI (14.3%).

7. Las principales indicaciones para la prescripción de tratamiento antifúngico empírico fueron los pacientes con cirugía abdominal de alto riesgo y la sepsis en pacientes no quirúrgicos. Las equinocandinas supusieron un 73% de los tratamientos antifúngicos (84% en la UCI y el 54% en otros servicios) y fue mantenido durante una media de 10 días.

8. En pacientes con sospecha de candidiasis invasiva en los que se ha iniciado un tratamiento antifúngico empírico, la determinación seriada de la combinación de CAGTA y BDG en los primeros cinco días obtuvo muy alto valor predictivo negativo, del 100% en los pacientes ingresados en la UCI.

9. La estrategia de la determinación seriada de CAGTA y BDG en los primeros cinco días de tratamiento podría permitir la retirada segura del tratamiento antifúngico empírico en un tercio de los pacientes.

10. La estrategia de la determinación seriada de CAGTA y BDG podría ser útil como herramienta complementaria en los programas de Antifungal Stewardship.



# INTRODUCCIÓN

## **1. ASPECTOS BÁSICOS DEL GÉNERO *CANDIDA***



## 1.1 DESCRIPCIÓN TAXONÓMICA DEL GÉNERO *CANDIDA*

Dentro del Reino Fungi hay descritos más de 100.000 especies de hongos de los cuales aproximadamente 100 son conocidos patógenos humanos y animales. Y, cientos de ellos son oportunistas en los mismos.

Taxonómicamente, el género *Candida* pertenece al Reino *Fungi* (*Eumycota*); división *Ascomycota*; clase *Saccharomycetes* (= *Hemiascomycetes*, *Endomycetes*); al orden *Saccharomycetales*. Y, principalmente se encuentran dentro de la familia *Endomycetaceae* [4].

## 1.2 ESPECIES DE *CANDIDA* CONOCIDAS

Se conocen aproximadamente 200 especies de *Candida* de las cuales sólo unas pocas son patógenas oportunistas para el hombre [5].

El 90-95% de las especies de *Candida* aisladas de pacientes con candidiasis pertenecen a las especies de *Candida albicans*, *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis*, *Candida tropicalis* y *Candida krusei* [6, 7].

Pero, además, con el desarrollo y el avance de las técnicas moleculares y los estudios multigénicos han aparecido especies crípticas, fenotípicamente similares pero genéticamente distintas, como *Candida dubliniensis*, próxima a *Candida albicans*; *Candida metapsilosis* y *Candida orthopsilosis* relacionadas con *Candida parapsilosis*; y, *Candida nivariensis* y *Candida bracarensis* como especies gemelas de *Candida glabrata* [8].

### 1.3 METODOS DE IDENTIFICACIÓN DE LABORATORIO

La identificación de las especies de *Candida* se puede llevar a cabo mediante criterios morfológicos, bioquímicos, inmunológicos o genéticos [9].

#### MÉTODOS CONVENCIONALES

Los métodos convencionales, estandarizados, atienden principalmente a la identificación macroscópica y microscópica de las levaduras (morfología de las colonias en medio de cultivo y características microscópicas de las levaduras) , a criterios bioquímicos (métodos cromogénicos como el CromAgar); y a la identificación basada en métodos de asimilación de nutrientes (Auxograma, API 20C, Vitek 2®, etc) entre otras [9]. Sin embargo, estos métodos presentan limitaciones como la baja sensibilidad y la lentitud en los resultados [10]; además, ninguna de ellas identifica especies crípticas.

#### NUEVAS TECNOLOGÍAS EN LA IDENTIFICACIÓN DE *CANDIDA* SPP

Las nuevas tecnologías más novedosas ya carecen de la necesidad del aislamiento de *Candida* en cultivo, permitiendo su aplicación a muestras clínicas (hemocultivos, sangre completa, líquido peritoneal, LCR y tejidos) [11] y confiriendo mayor rapidez diagnóstica que las técnicas convencionales. En general, son más sensibles y específicas, principalmente las **técnicas de amplificación de ácidos nucleicos** (multiplex PCR y PCR panfúngicas (“broad-range PCR”) [11, 12] y relacionadas, como las **técnicas de hibridación de ácidos nucleicos** -hibridación in-situ y nanotecnología (T2*Candida*, T2MR, PNA-FISH, otras) [13]. Pero, aunque ventajosas, también muestran limitaciones, como el precio, la falta de

estandarización o la detección de ácidos nucleicos de levaduras no viables. Por su parte, la **secuenciación multigénica** en *Candida* spp permite identificar especies crípticas y la expresión de genes de resistencia a los antifúngicos habituales [14]. **Las técnicas de reconocimiento de patrones de proteínas**, MALDI-TOF MS, también son técnicas prometedoras en el diagnóstico de candidiasis invasiva [11, 15-17].

Todas estas nuevas tecnologías, superiores, podrían ser a medio o largo plazo sustitutas de las técnicas convencionales [18].

#### 1.4 BREVE DESCRIPCIÓN DE LA FISIOLÓGÍA DE LOS HONGOS

El género *Candida* está formado por hongos unicelulares, eucariotas, anaerobios facultativos sin muchas exigencias en cuanto a pH (2-9) y a temperatura (10°C-40°C). Presentan diversas características químicas y biológicas, dentro de sus diferentes estructuras y formas morfológicas, que son necesarias para su supervivencia y su patogenicidad. [19-21].

Cabe destacar por su relevancia clínica, diagnóstica y de tratamiento:

#### CARACTERÍSTICAS GENÉTICAS DE CANDIDA

Como eucariota, *Candida* presenta cierta complejidad en su genoma, que les confiere una gran plasticidad y dinamismo dando lugar a una gran diversidad genética inter e intraespecie [22, 23], a través de mecanismos muy complejos (variaciones en la organización del cromosoma y en su número de copias) similares a los observados en las células de cáncer, en muy corto espacio de tiempo, que les permite adaptarse a la situaciones de estrés [22, 24-26]. La respuesta producida en *Candida* puede implicar

resistencias a los antifúngicos en distintos grados [22, 27] o la aparición de cepas más virulentas [28].

## **PARED CELULAR**

La mayoría de las funciones biológicas asociadas a la patogenicidad y la virulencia en *Candida* spp están relacionadas con su pared celular, que la confiere protección frente a los mecanismos de defensa del huésped e inicia el contacto directo con sus células mediante la adherencia a su superficie [20, 21, 29]. La pared, además, es una importante fuente de determinantes antigénicos y de componentes que afectan al equilibrio homeostático del huésped a favor del hongo, mediante la modificación cualitativa y cuantitativa de los mismos, haciendo posible las sucesivas etapas de la infección. El 80-90% de los componentes de la pared de *Candida* spp son carbohidratos, siendo los mananos,  $\beta$ -glucanos y la quitina los principales constituyentes estructurales de la misma [20, 29]. Los lípidos, junto con las proteínas son, por su parte, los integrantes de la pared que se encuentran en menor proporción, de 1 a 7%, y de 6 a 25%, respectivamente [30], y también portadores de importantes funciones para *Candida* spp [20, 21, 31].

### **Desde el punto de vista inmunológico**

Proteínas y carbohidratos de la pared celular de *Candida* spp, liberados al medio durante su crecimiento, inducen una respuesta humoral en el huésped dando lugar a anticuerpos protectores, ocasionalmente tóxicos e inductores de shock anafiláctico [21]. Los mananos, unidos a las manoproteínas, son los más potentes

inductores de la respuesta inmune; mientras que el 1,3-  $\beta$  -glucano produce una respuesta inmunógena menos activa dando lugar a una protección pasiva frente a la infección por *Candida* spp [29]. Tanto los antígenos como los anticuerpos producidos frente a aquellos de la pared celular de *Candida* spp se han empleado como dianas para el diseño de las técnicas diagnósticas [29] alguna de ellas, las más recientes, muy prometedoras tanto en el diagnóstico como en el pronóstico de la candidiasis invasiva [32].


## FORMAS MORFOLÓGICAS DE CANDIDA

Existen tres morfologías celulares en *Candida* spp: levadura (blastoconidias), pseudohifa e hifa, que son las etapas evolutivas de *Candida* en respuesta a una amplia variedad de estímulos ambientales en el huésped como suero, Tª corporal, pH, hormonas, etc [33] habiendo, en el paso de unas a otras, todo un proceso de desarrollo estructural y bioquímico necesarios para todas sus funciones, incluyendo patogenicidad y virulencia.

En la mayoría de los hongos patógenos, la morfología de hifas y la expresión de genes específicos de hifas son cruciales para la virulencia. En *Candida*, son representativos los genes de adhesinas *ALS3* y *HWP1*, los de secreción de enzimas de degradación; o, los de protección del hongo frente a las defensas del huésped entre otros. Sin embargo, todo esto no es suficiente para la virulencia ya que el proceso está sometido a mecanismos, “dosis dependiente”, reguladores de las morfologías de pseudohifas y de hifas [33]. Así, las pseudohifas expresan genes de hifas, a niveles

significativamente inferiores, implicando un menor grado de virulencia que aquellas [34]. Además, con esta morfología, modulan la invasividad y la virulencia en los tejidos donde el nivel de nutrientes y de otros recursos no son los óptimos en un momento específico de la infección, comportándose como un adaptador evolutivo para el desarrollo de un patrón de infección nicho-específico [35].

**Tabla 1.** Funciones de *Candida* spp según su morfología

Tiempo expresión de genes de virulencia	Morfología	Funciones
 -	<b>Levadura</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Colonización de superficies mucosas, adhesión a superficies del huésped y producción de biofilm</li> <li>- Diseminación a los tejidos del huésped</li> </ul>
	<b>Pseudohifa</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Mejor asimilación de nutrientes</li> <li>- Probable motilidad</li> </ul>
	<b>Hifa</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Invasión de tejidos del huésped y de la capa mucosa de las células epiteliales</li> <li>- Deterioro de las células endoteliales</li> <li>- Lisis de macrófagos y neutrófilos</li> <li>- Tigmotropismo</li> <li>- Variación antigénica</li> </ul>
+		

## FACTORES DE PATOGENICIDAD DE *CANDIDA* SPP

El conocimiento de los mecanismos de patogenicidad y la capacidad de adaptación (fitness) a los diferentes nichos del huésped es crucial para el desarrollo de nuevos antifúngicos y para el diagnóstico de la candidiasis invasiva [36].

Cabe destacar:

a. **Dimorfismo levadura - hifa.** Ambas morfologías son importantes para la virulencia, presentando funciones específicas (tabla 2) según los distintos estadios de la candidiasis [36, 37].

**Tabla 2.** Dimorfismo en la actividad fúngica

**Morfología**

<b>Actividad fúngica</b>	<b>Levaduriforme</b>	<b>Hifa</b>
Expresión de genes asociados a hifas	Bajo ciertas condiciones	Por definición
Adhesión	Moderada	Fuerte
Invasión		
Inducida por endocitosis	Baja	Moderada
Por penetración activa	Ninguna	Alta
Daños	Ninguno	Alto
Diseminación	Por sangre	A través de barreras epiteliales; Interepiteliales
Adquisición de hierro vía ferritina	No descrito	Vía Als3
Escape de los fagocitos	No descrito	Si

Adaptada de Jacobsen y col [37].

b. **Expresión de adhesinas e invasinas** en la superficie celular, que se inducen simultáneamente con la producción de hifas. Por medio de ellas, se adhieren a otros microorganismos, superficies abióticas y células del huésped. Las mejor caracterizadas son las Als (agglutinin-like sequence) y las Hpw1, [37].

c. **El tigmotropismo o “contact sensing”** permite la adaptación de la levadura a la orografía irregular de las superficies facilitando la invasión y el daño celular [36].

d. La **formación de biofilm**, población de microorganismos adheridos unos a otros y/o a una superficie y sustentados por una matriz extracelular [38], confiere un

papel de resistencia a los antifúngicos [39] así como de una mayor patogenicidad a la levadura [40, 41].

e. El **switching fenotípico**, por su parte, induce reordenamientos genéticos reversibles, y ocurre en los lugares de infección. Se ha relacionado con la modulación de determinados factores de virulencia como la alteración, directa o indirecta, de la expresión de genes (de virulencia, etc), de resistencia a antifúngicos, de formación de biofilm y habilidad de producir hifas [42, 43].

f. La secreción de **enzimas hidrolíticas** contribuyen a la invasión de los tejidos mediante la degradación de moléculas y membranas celulares del huésped. Las más estudiadas son las **proteinasas** aspárticas secretadas (SAPs: secreted aspartic proteinases), las **lipasas** (Lips) y la **fosfolipasa** PL-B [36, 44].

Adicionalmente, *Candida* tiene atributos de fitness que implican **adaptación a fluctuaciones en el pH del medio** mediante las enzimas B-glicosidasas Phr1 y Phr2. Además presentan una gran **flexibilidad metabólica** y poderosos sistemas de **adquisición de nutrientes** (metales) y unos potentes mecanismos de **respuesta al estrés** tales como al choque térmico, osmótico, oxidativo y nitrosativo [36].

## 1.5 ESTADÍOS DE LA INFECCIÓN POR *CANDIDA* SPP

*Candida* spp es un microorganismo altamente especializado para adaptarse y sobrevivir en diversos ambientes. Sin embargo, para que se produzca la transición del microorganismo comensal al patógeno deben producirse ciertas alteraciones en el huésped, permitiendo la infección de cualquier órgano o tejido y dando lugar a una amplia variedad de infecciones con distintos grados de severidad.



## CLAVES PARA LA INFECCIÓN POR *CANDIDA* SPP

El desarrollo de la infección por *Candida* spp depende de varios factores:

- a. Daño de las barreras de la piel o de las barreras mucosas [45].
- b. Dosis o tamaño del inóculo fúngico.
- c. Estado del sistema inmunitario defensivo del huésped [19, 37, 45, 46].
- d. Factores de virulencia del hongo (papel crucial del dimorfismo).

Colonización, adhesión, invasión y daño son los estadios durante la patogénesis de *Candida* spp.

## COLONIZACIÓN

La colonización por *Candida* spp es habitual en el 30-70% de individuos sanos, sin que ello tenga ninguna implicación clínica. Sin embargo, dependiendo de la población colonizada, ésta podría indicar una posible infección, ya que la transición entre colonización e invasión lleva asociada un cambio del equilibrio dinámico huésped-hongo [46], donde existe un umbral de tolerancia de carga fúngica que delimita ambos estados [47]. La colonización por *Candida* spp está asociado a un proceso inflamatorio que es tanto mayor cuanto mayor sea el grado de colonización [47], mediante la liberación de citoquinas pro-inflamatorias, IL-17A [48, 49].

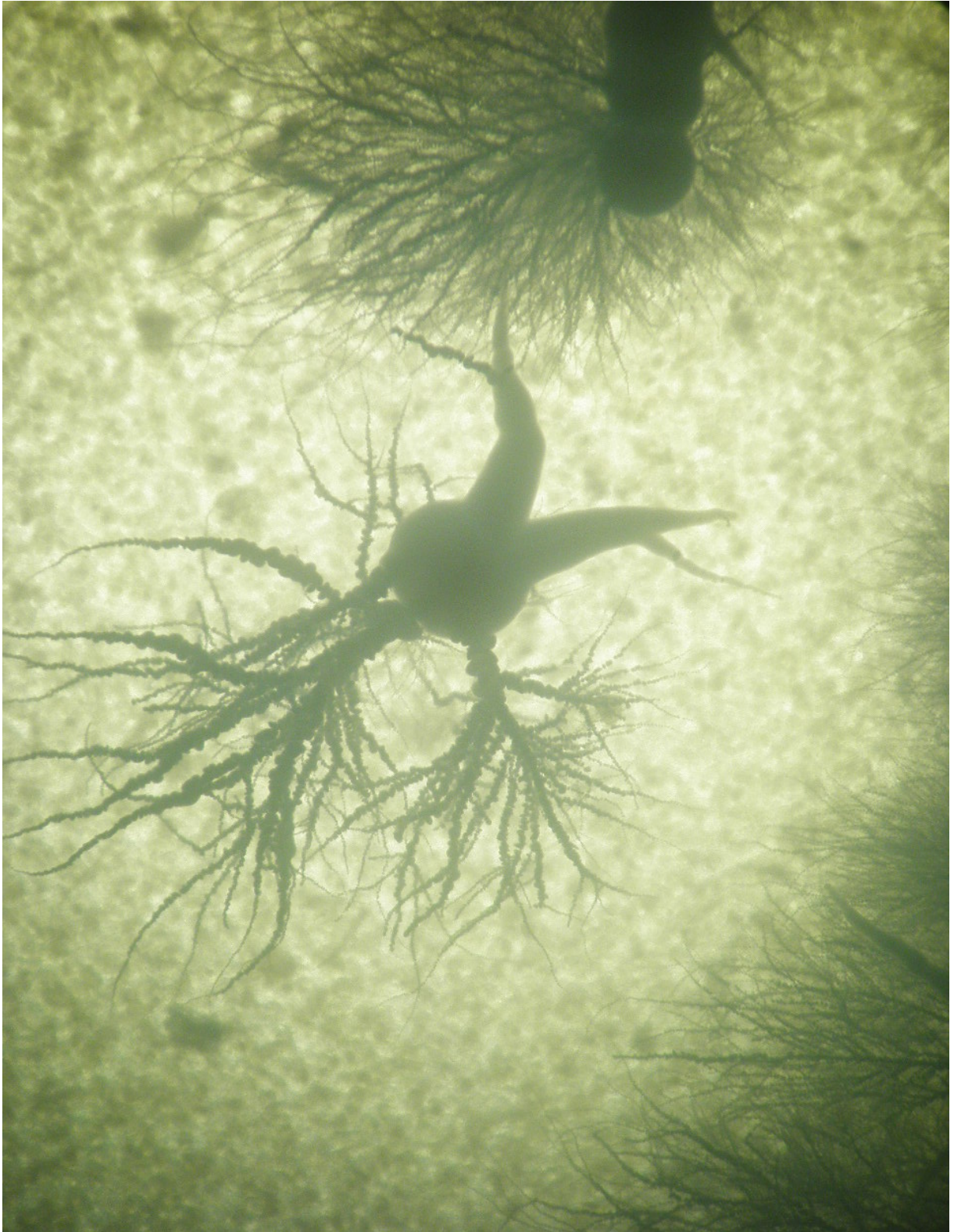
## ADHESIÓN, INVASIÓN Y DAÑO

La invasión, estado patogénico verdadero, de las células del huésped sucede en dos etapas consecutivas y dependientes: adhesión e invasión. Se inicia con un

proceso de inflamación, característico de la enfermedad fúngica, ya iniciado muchas veces durante la colonización y necesario para mantener un punto de apoyo para su proliferación en el epitelio y evitar su desprendimiento de las superficies epiteliales [46].

Los **mecanismos de invasión** de las células del huésped por *Candida* spp son, **endocitosis inducida**, mediada por invasinas asociadas a hifas ; y la **penetración activa**, producida por el avance de la punta de las hifas y la secreción de hidrolasas extracelulares. Además, mediante la degradación proteolítica de las uniones intercelulares o transportados dentro de los leucocitos también son capaces de atravesar las barreras de celulares [44, 50, 51].

El **daño en el huésped** está directamente causado por la invasión interepitelial, potenciándose con la extensión de las hifas que, finalmente inducirán un proceso de apoptosis necrotizante (**piroptosis**) [46]. Sin embargo, al daño del huésped contribuye la sobreactivación del sistema inmune con la infiltración masiva de neutrófilos o un desequilibrio en la respuesta sistémica dando lugar a la sepsis [46].



## **2. CANDIDIASIS INVASORA. EPIDEMIOLOGÍA**

## 2.1 ORIGEN DE LA CANDIDIASIS: ENDÓGENO FRENTE A EXÓGENO

Tras décadas estudiando cuál es el origen de la candidiasis, piel o tracto gastrointestinal, aún no ha quedado clara la frecuencia con que éstos posibles orígenes dan lugar a la diseminación de *Candida* spp. Cerca del 54% de los pacientes con candidemia no tienen una puerta de entrada definida [45, 52].

La mayor parte de las infecciones por *Candida* spp, según estudios de genotipado, son de **origen endógeno** [53], surgiendo infecciones por cepas de *Candida* spp pertenecientes a la microbiota normal del huésped. Así, la presencia de *Candida* spp en el tracto digestivo es un factor de riesgo de candidemia en determinados grupos de pacientes, asociándose el sobrecrecimiento de *Candida* spp a este nivel con la traslocación intestinal de *Candida* spp en casos de cirugía abdominal, trasplante hepático, pancreatitis o mucositis [52, 54].

El **origen exógeno** de la candidiasis, por su parte, se debe básicamente a la ubicuidad de *Candida* spp en el ambiente hospitalario, en el cual puede sobrevivir más de cuatro meses, que junto con su capacidad de producir biofilm hace que con frecuencia colonice dispositivos médicos, documentándose el catéter como principal origen de candidemia de origen exógeno. La transmisión horizontal (persona a persona) y brotes epidémicos (contaminación de las manos del personal sanitario) son otras de las causas de la candidiasis de origen exógeno [45, 54, 55].

Ambos orígenes, endógenos y exógenos, pueden coexistir en el ámbito clínico [53].

## 2.2 TIPOS DE CANDIDIASIS INVASIVA

Las infecciones por *Candida* spp se cuentan entre las micosis más frecuentes. Pueden afectar a piel, mucosas y órganos profundos, siendo estas últimas, las que reciben el nombre de candidiasis invasivas y las que revisten mayor gravedad e interés clínico.

Su procedencia posible es la diseminación hematógica o la inoculación directa de *Candida* spp en un sitio habitualmente estéril. Pueden permanecer localizadas en un determinado órgano o tejido, extenderse a lugares contiguos o dar lugar a una candidemia secundaria. Con todo esto, en el diagnóstico de candidiasis invasiva éstas deben clasificarse dentro de tres formas definidas: candidemia, candidiasis invasiva con candidemia y candidiasis invasiva sin candidemia asociada [56, 57].

### CANDIDEMIA SIN INFECCIÓN PROFUNDA

Se definen como al menos un hemocultivo positivo sin ningún foco específico de infección [57]. Normalmente son de origen exógeno (catéter, inoculación directa a sangre) aunque origen endógeno (traslocación intestinal al torrente sanguíneo) también se ha descrito.

La mayor parte de las candidiasis de las UCIs son candidemias primarias (39,5%) [57], constituyendo aproximadamente el 6,7% de todas las infecciones primarias del torrente sanguíneo en UCI [58, 59]. En los pacientes hematológicos, sin embargo, podría ser incluso mayor ya que se ha visto que la mitad de las candidemias no llevan asociada infección profunda [56, 60].

### **CANDIDIASIS INVASIVA CON CANDIDEMIA**

Se define como la positividad para *Candida* spp en al menos un hemocultivo y en otra muestra de lugar normalmente estéril, relacionada con un foco específico de infección [57]. En la mayoría de los casos la candidemia aparece en el curso de una candidiasis invasiva tardía [61], constituyendo un tercio de los pacientes de UCI con candidiasis (28,4%) [57]; y, el 6,5% de todas las infecciones en sangre secundarias a focos profundos [59]. Se incluyen aquí los casos donde la candidiasis invasiva profunda es secundaria a una candidemia [61, 62]. Infecciones por *Candida* spp como endocarditis [63, 64], endoftalmitis y/o coriorretinitis [65], candidiasis osteoarticular [62], la candidiasis hepatoesplénica [66], candidiasis en SNC [64] son habitualmente secundarias a una candidemia.

### **CANDIDIASIS INVASIVA SIN CANDIDEMIA**

Una muestra positiva para *Candida* relacionadas con un foco específico de infección, pero con hemocultivos negativos se considera candidiasis invasiva sin candidemia [57]. Puede proceder de una inoculación directa o bien de una diseminación hematógica [67].

El 50% de las candidiasis invasivas tienen los hemocultivos negativos [56]. Cerca de un tercio de las infecciones profundas por *Candida* producidas en las UCIs (32,1%) cursan sin candidemia [57].

La candidemia raramente se produce en las candidiasis invasivas localizadas, aunque existen situaciones en las que es factible la aparición de *Candida* spp en sangre, como las producidas en ciertos casos de obstrucción del tracto urinario e infección por *Candida* spp [61, 68] y mas raramente dentro del contexto de una infección intraabdominal tardía [55, 67, 69, 70].

### 2.3 EPIDEMIOLOGÍA: INCIDENCIA GEOGRÁFICA DE LA CANDIDIASIS

La epidemiología de la candidiasis invasiva es bastante heterogénea según su localización geográfica [71]. En general, la incidencia de la candidemia, medidos por 100.000 habitantes/ año, se ha estimado en 1-8 casos [72, 73]. Esta incidencia es mayor en América que en Europa, 6-8,7 casos frente a 1,4-5,7 casos, respectivamente [71, 72, 74]; con la apreciación de grandes variaciones en América, siendo la incidencia más alta en Baltimore 26,2 episodios por 10<sup>5</sup> habitantes [75] o en Taiwan [76] en comparación con las no tan marcadas diferencias europeas [6, 71, 73, 77-79].

España presenta una incidencia de 8,1 casos, muy similar a la de otros países europeos, con un ligero incremento por 1,88 en la última década [6, 71, 73, 80].



Tabla 3. Incidencia de la candidemia según su localización geográfica.

Localización geográfica	Incidencia de candidemia		Referencias
	Por 10 <sup>5</sup> hab/año	Por 1000 ingresos	
<b>Población general</b>	1-8		[72, 73, 81]
<b>América</b>			
Canadá	2,9		[82]
EEUU	6-8,7	0,28-0,96	[6, 72]
Atlanta/Baltimore	13,3-26,2		[72]
Latino-américa		0,33-1,96	[6, 83]
México		2,8	[84]
Brasil		1,38-2,49	[75, 83]
Chile		0,33	[83]
colombia		1,96	[83]
<b>Europa</b>		0,2-0,38	
Norte/centro	1,4-5,7		[58, 77, 79, 85]
España	8,1	0,89	[71]
Dinamarca	8,6		[78]
<b>Oceanía</b>			
Australia	1,8		[86]
<b>Asia</b>		0,25-2,93	[76]
Hong Kong		0,25	
Taiwan		2,93	
Shanghai		3,2	[87]
<b>África</b>			
Sudáfrica	9		[88]

Estas diferencias en la incidencia de la candidemia podría estar influenciada por el diferente manejo de los pacientes con candidiasis, factor mejorable mediante la correcta adherencia a las guías clínicas locales e internacionales [71].

### Mortalidad global

La mortalidad atribuible a la candidiasis invasiva representa un porcentaje aproximado del 47%, variando según los grupos de pacientes [89-92]. En adultos representa entre el 15-35%. De esta, un 13% corresponde a la mortalidad relacionada (mortalidad a los 0-7 días; asociada al tratamiento y la retirada de catéter) y un 30% a

la mortalidad no relacionada o tardía (mortalidad a los 8-30 días y relacionada con la enfermedad de base del paciente) [73].

## **2.4 EPIDEMIOLOGÍA: POBLACIONES AFECTADAS.**

Los aislamientos de *Candida* spp se distribuyen en una proporción prácticamente igual entre los pacientes de las UCIs y los pacientes de otros servicios, sugiriendo que la candidiasis invasiva no es una infección relacionada exclusivamente con las UCIs [6, 93, 94].

La epidemiología de la candidiasis invasiva varía significativamente en función del tipo de paciente debido a la existencia de diferencias epidemiológicas, mayor en varones y en edades extremas, a los diferentes factores de riesgo (la incidencia de la CI en el paciente con cáncer se ha estimado en 71 casos por 100.000 habitantes [6]), a los específicos mecanismos fisiopatológicos de desarrollo de candidiasis invasiva e incluso en el desigual manejo del paciente [53, 95]. Si bien el paciente hematológico neutropénico, el receptor de trasplante de órgano sólido (TOS) y el paciente crítico no neutropénico de UCI han sido las poblaciones más estudiadas en el contexto de la infección fúngica, existen otros grupos de pacientes que reúnen múltiples factores de riesgo de candidiasis invasiva y que desarrollan la infección en un entorno bastante diferente de los mencionados anteriormente. Igualmente, de forma habitual se habla de la candidiasis invasiva como una infección oportunista dentro del contexto de una inmunosupresión preexistente o unos factores de riesgo específicos de candidiasis invasiva, pero sin embargo, la mayor parte de los pacientes que tienen una candidiasis

invasiva no tienen una inmunosupresión, al menos manifestada dentro de unos estándares clínicos [52]. Por ello, es necesario el reconocimiento y la estratificación de los pacientes inmunodeprimidos y no inmunodeprimidos en varias categorías de pacientes de bajo, medio y alto riesgo para el desarrollo de la infección [53, 76, 95-97].

En la tabla 4 se recogen los diferentes factores de riesgo más característicos de cada grupo de riesgo así como la incidencia de la candidiasis invasiva y la mortalidad asociados a ellos.

#### **Paciente hematológico frente a paciente con tumor sólido**

Los pacientes con **cáncer hematológico** tienen especiales factores de riesgo asociados a la neutropenia, el tratamiento con corticoides; sin embargo, en el paciente con **tumor sólido** los factores de riesgo de desarrollo de CI son el resultado de las complicaciones asociadas a la cirugía y al ingreso en la UCI [6, 95, 98] reforzándose la idea de que ni la neutropenia ni los esteroides son cruciales para el desarrollo de candidemia en estos. Tanto la incidencia de la candidiasis invasiva como la mortalidad a los 30 días de candidiasis es más elevada en el paciente con tumor sólido que en el hematológicos 22-55% y 65%, frente a el hematológico 2-5% y 38-50%, respectivamente [95, 99, 100].

Tabla 4. Factores específicos de riesgo, incidencia y mortalidad en diferentes grupos de población.

Tipo de paciente	Factores de riesgo específicos	Incidencia	Mortalidad	Referencias
Hematológico	Neutropenia post-QT	2-5%	38-50%	[95]
	Uso de corticoides			[101]
Hematológico	Mucositis digestiva			[100]
	Catéteres tunelizados			[99]
Tumor sólido	Complicaciones asociadas a cirugía (C abdominal)	22-55%	65%	[95]
	Ingreso en UCI			[101]
Tumor sólido	Ventilación mecánica			[102]
	NPT, CVC			[98]
TOS	Íleo paralítico			
	Anaerobicidas			
TOS	Edad avanzada			
	<b>Generales:</b>			
TOS	Intensa supresión de la respuesta celular T	1,9% en general (a los 6 y 12 meses) 25-59% en ID	30-50%	[103]
	Inmunosupresores			[104]
TOS	Fallo renal agudo	ID>> páncreas		[105]
	Infección reciente por CMV			[53]
TOS	Rechazo agudo de órgano	>hígado > corazón=riñón		
	Cirugía temprana de exploración			
TOS	Colonización por <i>Candida</i> spp	>pulmón.		
	<b>Específicos:</b>			
TOS	Tipo de trasplante			
	Tipo de anastomosis quirúrgica			
UCI médica	Continuo y prolongado soporte vital	0,24-34,3/ 1000 ingresos	20-49%	[53]
	Antibióticos de amplio espectro			[58]
UCI médica	Uso de múltiples dispositivos (CVC, SV, tubos endotraqueales, sondas enterales)			[59]
	Larga estancia en UCI			[106]
UCI médica	Colonización por <i>Candida</i> spp			

(Continuación)

Tipo de paciente	Factores de riesgo específicos	Incidencia	Mortalidad	Referencias
UCI quirúrgica	Cirugía abdominal recurrente	0,24-34,3/ 1000 ingresos	20-49%	[70]
	Perforación del tracto gastrointestinal			[53]
	Peritonitis recurrentes			[107]
	Pérdida de anastomosis o inflamación persistente			[106]
	Pancreatitis necrotizante severa			
	Colonización por <i>Candida spp</i>			
	Extensión y profundidad de la quemaduras			[45]
	Catéter venosos			[108]
Paciente quemado	Atrofia de la mucosa gastrointestinal	2-21%	30-90%	
Pacientes de servicios médicos	Edad del paciente	24-57%	40-50%	
	Edad avanzada (>65 años)			[109]
	Múltiples comorbilidades			[110]
	Disminución de la respuesta biológica y de la respuesta al estrés (declive de los sistemas fisiológicos)			[111]
	Disminución de la respuesta inflamatoria y de la inmunidad innata y adaptativa			[112]
	Atb de amplio espectro el mes previo			
	sonda urinaria o de catéter venosos centrales, NPT, los tumores sólidos, polimedicación			

**Paciente sometido a trasplante de órgano sólido (TOS)**

La candidiasis invasiva (53% de todas las IFIs en TOS) en el paciente trasplantado aparece generalmente dentro de los tres primeros meses post-trasplante (media de 103 días), pudiendo aparecer más allá de este periodo [113]. En este grupo de pacientes existe una jerarquía de factores de riesgo, basados en el tipo de trasplante, en las enfermedades de base, las comorbilidades, las técnicas quirúrgicas, entre otras variables [104, 113]. Todas ellas contribuyen al uso del antifúngico profiláctico en el paciente con TOS, en los cuales el desarrollo de las infecciones de brecha por cepas de *Candida* spp resistentes a los antifúngicos es muy posible [53].

La incidencia acumulada de la candidiasis invasiva a los 6 y a los 12 meses post-trasplante, respecto de otras IFIs, es la mayor de todas con un 1,9%, variando según el tipo de trasplante y del centro donde se realiza. El intestino delgado es el tipo de trasplante con mayor incidencia de candidiasis invasiva (25-59%) seguido de los trasplantes de páncreas, hígado, corazón=riñón y pulmón [103]. La candidemia es la entidad más común de CI (> 60% de los casos) seguido de la infección del tracto urinario y de la peritonitis por *Candida*. La mortalidad del paciente trasplantado a los 12 meses post-infección está entorno al 30-50% [104, 105].

**Paciente crítico: UCI médica frente a UCI quirúrgica.**

En general, la candidiasis invasiva surge como una complicación derivada de las múltiples enfermedades de base en el paciente crítico o de las intervenciones quirúrgicas a las cuales son sometidos. En el **paciente de la UCI médica** un continuo y prolongado soporte vital y el uso de antibióticos de amplio espectro constituyen la

base de los factores de riesgo para el desarrollo de candidiasis invasiva. Esto deriva en el uso de múltiples dispositivos médicos, facilitando la colonización progresiva por *Candida* spp (en hasta el 80% de los pacientes) y en el desarrollo de biofilm, explicando el catéter como principal origen de la candidemia en ausencia de un compromiso severo del sistema inmunitario [53]. Los **pacientes de UCIs quirúrgicas**, sin embargo, presentan factores de riesgo adicionales asociados a la cirugía, principalmente abdominal. Aunque la presencia de *Candida* spp en la peritonitis nosocomial con o sin shock séptico, salvo excepciones, tiene un significado clínico cuestionable (Montravers et al, 2014), en las peritonitis recurrentes con pérdida de anastomosis o inflamación persistente, o de pancreatitis necrotizante severa, *Candida* spp puede evolucionar desde una simple colonización a una infección progresiva. Estas particularidades explican la alta proporción de candidiasis invasiva sin candidemia y que, de desarrollarla lo hacen en el curso de una infección tardía [53].

La cifra más reciente de incidencia de candidemia en UCI es de 0,24-34,3 por cada 1.000 ingresos con unos ratios de mortalidad que oscilan entre 20-49% [106, 114].

### **El paciente quemado**

El principal factor de riesgo para desarrollar candidiasis invasiva en estos pacientes es la propia herida, que será tanto mayor cuanto mayor sea la extensión y profundidad de la quemadura, así como la edad del paciente.

La ubicuidad del hongo en el ambiente hospitalario y la falta de protección del paciente quemado, por destrucción de la piel, le hacen especialmente vulnerable, por supresión de la inmunidad celular, que combinado al uso de antibióticos de amplio espectro permite el sobrecrecimiento de *Candida* spp en unas dañadas superficies mucosas, que se correlacionan con el porcentaje de cuerpo quemado, siendo el íleo una complicación frecuente en aquellos pacientes con >25% de superficie corporal quemada. Además, la presencia de un catéter le proporciona un riesgo añadido con respecto a otras cohortes de pacientes hospitalizados [45, 108].

El paciente quemado presenta una incidencia de candidiasis invasiva muy variable, 2-21%, y de candidemia del 3-5%, con una mortalidad cruda que se estima del 30-90%. [45].

### **Pacientes ingresados en servicios médicos**

Estos pacientes representan un importante reservorio de candidemia con una incidencia del 24-57% y una mortalidad de 40-50%, que es muy superior que la de los pacientes ingresados en otros servicios [76, 109-112]. Cuentan con aspectos clínicos y epidemiológicos peculiares en unos pacientes de edad cada vez más avanzada (>65 años) y altamente complejos, “paciente anciano frágil” [115] con múltiples comorbilidades (diabetes mellitus, etc.) y una disminución de la reserva biológica y de la respuesta al estrés (disminución de la respuesta inflamatoria y de la respuesta inmunitaria innata y adaptativa) contribuyendo a una mayor susceptibilidad a la infección fúngica. Coexisten también factores de riesgo como la administración de



antibiótico de amplio espectro, 1 mes previo del ingreso hospitalario, ser portadores de sonda urinaria o de catéter venosos centrales, NPT, los tumores sólidos, polimedicación, entre otras cosas [112]. La alta complejidad de estos pacientes hace que su manejo resulte deficiente tanto en el diagnóstico como en el tratamiento antifúngico. La consecuencia de ello es un retraso considerablemente, >48 horas, del inicio de un tratamiento correcto, cuando la candidiasis es, en ocasiones, tardía. La mayor proporción de los pacientes son tratados a partir de las 72 horas del primer hemocultivo positivo y un 69% de ellos comienzan a tratarse por encima de las 96 horas [109, 110, 112].

## 2.5 EPIDEMIOLOGÍA: DISTRIBUCIÓN DE LAS ESPECIES DE *CANDIDA*

*C. albicans*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* y *C. krusei* suponen el 95% de todos los aislamientos de *Candida* en sangre. El resto de las especies de *Candida* spp prácticamente se podrían considerar como anecdóticas. *C. albicans* sigue manteniéndose en primera posición de las especies más aisladas en todo el mundo (65%), aunque se ha modificado a la baja en detrimento de *C. parapsilosis* y *C. tropicalis*. Su distribución va a depender de varios factores, como: área geográfica, servicio de ingreso, enfermedad de base o presión antifúngica; estos tres últimos tendrán su impacto en la distribución local de *Candida* spp [73].

En la **tabla 5** se muestra la **distribución geográfica de *Candida* spp**. En España, *Candida albicans* representa un 45,4% frente a las especies *no-albicans*, *Candida parapsilosis* (25%), *Candida glabrata* (13%) y *Candida tropicalis* (8%) [71, 73, 74]. Dentro de España

existen variaciones según las diferentes regiones de España, en el sur y este de España *Candida albicans* sigue predominando (53,1-54,5%) con respecto a las especies *no albicans*. En general, *Candida parapsilosis* ocupa un segundo lugar tras *Candida albicans* salvo en las regiones del este donde *Candida glabrata* tiene mayor número de aislamientos [116]. Con respecto a otros países, tanto en EEUU, Latinoamérica como países asiáticos, la proporción de *Candida albicans* fue inferior al resto de los países (37%). *Candida glabrata*, por su parte, es la segunda especie más aislada, 16-29% en EEUU y en varios países europeos, [73, 78, 79, 117].

Según características específicas de los pacientes, la **edad** es una de las razones de variación en la distribución de las especies de *Candida* spp. *Candida albicans* se aísla más en los pacientes mayores de 18 años, mientras que *Candida parapsilosis* está asociada a infecciones en edades más tempranas, relacionándose con el uso de catéteres o de NPT [6]. La prevalencia de *Candida glabrata* aumenta con la edad del paciente, al igual que *Candida tropicalis* y *Candida krusei*; asociándose también a cirugía abdominal previa, tumores sólidos [95, 98] y a situaciones de inmunosupresión. En los trasplantes de progenitores hematopoyéticos hay mayor prevalencia de *Candida krusei*, y en el TOS, *Candida albicans* y *Candida glabrata* son las especies más habituales [6, 95].

La presión antifúngica también tiene su impacto en la distribución de especies produciendo un desplazamiento de *Candida* spp según la presión de antifúngico ejercida [73].

Finalmente, con respecto a la epidemiología de los **servicios de ingreso**, *Candida albicans* predomina en la mayor parte de los servicios, principalmente en cirugía general (63,2%), en la UCI neonatal (54,4%) y en medicina interna (42,2%); mientras que *Candida parapsilosis* se aísla más frecuentemente en unidades de oncohematología pediátrica y de adultos [118, 121].

**Tabla 5.** Distribución geográfica de las especies de *Candida* spp

		CA	CT	CP	CG	CK	OTRAS	Ref.
Europa	<b>Total</b>	65%	7,9%	5,6%	11,7%	2,5%	7,3%	
	<b>España</b>	45,4%	7,7%	24,9%	13,4%	2%	>4%	[71, 73]
	Norte	46,5%	3,0%	26,5%	13,5%	3,0%	7,3%	[116]
	Sur	54,5%	9,7%	21,4%	7,8%	0,6%	5,8%	[116]
	Este	53,1%	4,6%	14,6%	18,5%	3,1%	6,2%	[116]
	Centro	48,7%	8,4%	24,6%	14,1%	2,1%	2,0%	[116]
	<b>Dinamarca</b>	57,1%	4,8%	3,7%	21,1%	4,1%	>2,4%	[73, 78]
	<b>Islandia</b>	56,0%	13,0%	5,0%	16,0%	2,0%	8,0%	[73, 79]
	<b>Italia</b>	44,2%	4,8%	37,7%	5,6%	1,3%	6,6%	[118]
	<b>EEUU</b>	38,0%	10,0%	17,0%	29,0%	1,0%	5,0%	[117]
America	<b>Canada</b>	51,2%	9,5%	12,5%	19,7%	4,4%	2,7%	[119]
	<b>Latinoamerica</b>	37,6%	17,6%	26,5%	6,3%	2,7%	9,3%	[83]
	<b>Asia</b>	41,4%	25,4%	12,1%	13,9%	1,94%	5,2%	[76]
Asia	Korea Sur	37,9%	19,9%	26,1%	11,3%	0,5%	4,5%	[120]
	Shanghai	37,2%	14,9%	19,8%	7,4%	4,1%	16,5%	[87]
CA: <i>Candida albicans</i> ; CT: <i>Candida tropicalis</i> ; CP: <i>Candida parapsilosis</i> ; CG: <i>Candida glabrata</i> ; CK: <i>Candida krusei</i> .								

## 2.6 EPIDEMIOLOGÍA: RESISTENCIA A ANTIFÚNGICOS

A nivel mundial (tabla 6), las resistencias a fluconazol y a equinocandinas varían, según la geografía y las diferencias en la práctica clínica, entre otras cosas [7]. Entre los años 2008-2009 la resistencia a los azoles y a las equinocandinas fue < 5%, siendo más prevalente entre los aislamientos nosocomiales de *Candida glabrata* [7]. Entre 2010-2011, la resistencia a las equinocandinas fue baja (0.0 to 1,7%), principalmente para cepas de *Candida albicans* y *Candida glabrata* portadoras de mutaciones en el gen *fks*. Pero la resistencia a fluconazol fue baja para *Candida albicans* (0,4%), *Candida tropicalis* (1,3%), y *Candida parapsilosis* (2,1%); mientras que el 8,8% de *Candida glabrata* fue resistente a fluconazol. Además, el 38% de las cepas de *Candida glabrata* resistentes a equinocandinas también fueron resistentes a fluconazol [125].

En Latinoamérica, la resistencia a fluconazol fue observada en un 5,3-7,1% de *Candida glabrata*. Además, se observaron cepas SDD, en 0,4% *Candida albicans*, 1,1% *Candida parapsilosis*, y 92,9% de *Candida glabrata*. Con anídulafungina, aparecieron cepas con sensibilidad intermedia en 4,8% *Candida glabrata*, 0,4% *Candida albicans* y 1,7% de *Candida tropicalis* con sensibilidad intermedia [83].

Europa, muestra unos ratios de resistencia al fluconazol entre 10-35% [124, 126] . Sin embargo, en España es inferior al 10%, con una clara disminución en los últimos años [74, 116, 127]; y las de equinocandinas <2%, las cuales están asociadas básicamente a cepas de *Candida glabrata* y de *Candida albicans*. En otros países, como en Dinamarca o en EEUU, sin embargo, se han llegado a aislar, en muestras clínicas,

más de un 10% de cepas de *Candida glabrata* resistentes a equinocandinas suscitando un serio problema [122, 128].

Tabla 6. Resistencias (%) a antifúngicos en distintas regiones del mundo

<i>Candida</i> spp	Antifúngico	América del Norte	Europa	Latino-América	Asia/Pacífico	Total
CA	Anidula	0	0	0	0	0
	Caspo	0	0,4	0	0,6	0,2
	Mica	0	0,4	0	0	0,1
	Fluco	0,6	0,2	0	0,6	0,4
	Posa	0,6	8,3	6,5	0,6	4,4
	Vori	0,6	0,2	0	0,6	0,4
CG	Anidula	1,6	1,7	0	3,8	1,8
	Caspo	1,6	1,7	0	1,9	1,6
	Mica	1,6	1,1	0	1,9	1,2
	Fluco	9,8	6,3	5,3	13,5	8,8
	Posa	3,3	2,9	5,3	5,8	3,5
	Vori	11,1	9,1	7,9	13,5	10,5
CP	Anidula	1,2	0	1,0	0	0,5
	Caspo	0	0	0	0	0
	Mica	0	0	0	0	0
	Fluco	0	3,1	1,0	5,4	2,1
	Posa	1,2	0,5	3,9	6,5	2,3
	Vori	0	0	0	1,1	0,2
CT	Anidula	0	0	0	0	0
	Caspo	0	0	0	0	0
	Mica	0	0	0	0	0
	Fluco	2,7	1,1	0	0	1,3
	Posa	7,3	7,9	2,6	0	5,3
	Vori	0,9	0	0	0	0,3
CK	Anidula	0	0	0	0	0
	Caspo	0	0	0	0	0
	Mica	0	0	0	0	0
	Fluco	100	100	100	100	100
	Posa	17,5	7,1	25,0	33,3	15,2
	Vori	2,5	0	0	0	1,3

CA: *Candida albicans*; CG: *Candida glabrata*; CP: *Candida parapsilosis*; CT: *Candida tropicalis*; CK: *Candida krusei*. Anidu: anidulafungica; Caspo: caspofungina; Mica: Micafungina; Fluco: fluconazol; Posa: posaconazol; Vori: voriconazol. Adaptado de Pfaller y col. 2013. [125]

### **3. EL PROBLEMA DIAGNÓSTICO**

### 3.1 EL PROBLEMA CLÍNICO

#### SIGNOS Y SÍNTOMAS INESPECÍFICOS

La candidiasis invasiva carece de signos patognomónicos de infección. Su presentación clínica es inespecífica en cuanto a sus signos y síntomas e indistinguible de una infección bacteriana. Suele manifestarse inicialmente como fiebre persistente a pesar de la antibioterapia de amplio espectro, con taquicardia y/o hipotensión, pudiendo desencadenar de inmediato un cuadro de respuesta inflamatoria sistémica con shock séptico y fallo multiorgánico. Pero, también pueden presentarse signos y síntomas clínicos derivados de la afección de determinados órganos (corazón, ojo, riñón e hígado...) derivados de la diseminación hematógena de *Candida* spp [89, 129, 130].

#### DIAGNÓSTICO BASADO EN FACTORES DE RIESGO Y “SCORES” PREDICTIVOS

La identificación de los pacientes con riesgo de candidiasis invasiva es primordial para reducir la mortalidad de la infección. Para ello se desarrollaron diferentes reglas predictivas. Aunque ninguna identifica adecuadamente a todos los pacientes infectados por *Candida* spp sin seleccionar una amplia cohorte de pacientes; y, la mayor parte de las reglas predictivas, si no todas, solo son aplicables a pacientes críticos ingresados en la UCI, su uso está muy extendido [89, 131, 132].

Junto con la colonización multifocal por *Candida* spp y la inmunosupresión, determinados factores de riesgo, como antibiótico de amplio espectro, NPT, CVC, cirugía (principalmente abdominal), depuración extra-renal, diabetes, VM prolongada, sepsis grave y “score” APACHE II [133], están asociados a un incremento de riesgo de



desarrollar candidiasis invasiva. Los habituales factores de riesgo son frecuente y comunmente incluidos en los más recientes "scores" predictivos, conduciendo al tratamiento del 10-20% de los pacientes ingresados en la UCI, sin evidencia definitiva de IFI en más de dos tercios de los pacientes con un antifúngico prescrito [90, 134, 135].

### **Tipos de modelos o "scores" predictivos**

**Modelos basados en criterios microbiológicos:** Los *índice de colonización* (IC) e *índice de colonización corregido* (ICC) diseñados por Pittet y col. definen una estrecha relación entre la colonización de alto grado y la infección por *Candida* spp [136].

**Modelos basados en criterios clínicos:** Dupont y col. aplicaron su modelo a pacientes quirúrgicos de UCI con peritonitis secundarias; el modelo de Michalopoulos y col. fue diseñado como herramienta predictiva de candidemia en pacientes sometidos a cirugía cardiotorácica ingresados en UCI. Este modelo selecciona a aquellos pacientes que se van a beneficiar de tratamiento antifúngico profiláctico [137]. Paphitou y col. proponen un modelo que identifica a los pacientes de alto riesgo de candidiasis invasiva ingresados en las UCIs quirúrgicas también, como una aproximación para la prescripción el tratamiento antifúngico profiláctico [138]. Los *índices de Ostrosky-Zeichner* y de *Ostrosky-Zeichner corregido* incluyen una combinación de antibiótico de amplio espectro y la presencia de catéteres venosos centrales con dos o más factores de riesgo, de cinco factores de riesgo incluidos [55, 139]. El modelo, finalmente, propuesto por Shorr y col. identifica seis factores de riesgo como discriminadores de candidemia en el momento del ingreso hospitalario de un paciente [140].

**Modelos basados en criterios clínicos y microbiológicos:** León y col., en su “*Candida Score*”, encontraron que los factores de riesgo independientes asociados a candidiasis invasiva eran cirugía al ingreso en UCI (principalmente abdominal), NPT, sepsis grave y colonización multifocal por *Candida* spp [141].

Como norma general, todos estos “scores” de predicción presentan muy buen VPN (72-100%) pero muy bajo VPP (4-43%), (tabla7), por lo que su utilidad reside en la selección de los pacientes con menos probabilidad de desarrollar candidiasis invasiva y que por lo tanto, no se benefician de un tratamiento antifúngico empírico. La mayor parte de los modelos predictivos, sin embargo, no han sido suficiente validados con estudios potentes [135].

Tabla 7. Modelos predictivos de candidiasis invasiva. Valores de S, E, VPP y VPN en función de la incidencia de la candidiasis invasiva.

Autores	Nombre modelo	Factores de riesgo	Base del modelo de predicción	Población	Incidencia de CI (%)	VPP (%)	VPN (%)	S (%)	E (%)
Pittet y col [136]	IC	Colonización multifocal, APACHE II alto y tto atb prolongado.	Microbiológica	Quirúrgicos y neonatos	38	66	100	100	100
	ICC					100	100	100	100
Dupont y col [142]	Grado C*	Sexo, origen de la peritonitis, fallo cardiovascular, antibiótico 48 hs previas.	Clínica	Quirúrgicos con peritonitis 2ª	32	67	72	84	50
Michalopoulos y Col [137]	4 FR	VM > 10 días, infección bacteriana/bacteriemia nosocomial, by-pass >120 min y Diabetes Mellitus.	Clínica	Cirugía cardiorácica	-	100	89	53,3	100
Paphitou y col [138]	Regla 2**	>4 días en UCI. Hemodiálisis, atb de amplio espectro y diabetes.	Clínica	Quirúrgicos	7	NA	NA	NA	NA
León y col [143]	<i>Candida</i> "score"	Colonización multifocal, cirugía abdominal, sepsis grave y NPT.	Clínica + microbiológica	Quirúrgicos/médicos	5,8	NA	NA	81	74
Ostrosky y col [139]	Original	Atb o CVC y al menos dos de: cirugía, inmunosupresores, pancreatitis, NPT, diálisis y esteroides.	Clínica	Quirúrgicos/médicos	3	9	97	34	94
Ostrosky y col [144]	Revisado	VM ≥48 hs., atb y CVC y al menos uno de estos: cirugía, inmunosupresores, pancreatitis, NPT, diálisis y esteroides.	Clínica	Quirúrgicos/médicos	3,7	10	97	50	83
Shorr y col [140]	6 FR	Edad <65, Tª < 98°F o alteración del estado mental, hospitalización previa (<30 días), VM al ingreso, caquexia o ingreso desde otro lugar de cuidados sanitarios.	Clínica	Todos los pacientes al ingreso	1,2	NA	99,6	90,7	28,9

Adaptado de Ahmed y col [135]. IC: índice de colonización; ICC: Índice de colonización corregido. FR: factores de riesgo. \*Grado C: tener al menos 3 de estos 4 factores de riesgo: mujer, peritonitis originada en el tracto gastrointestinal superior, fallo cardiovascular intra-operatorio y haber recibido antibiótico al menos las 48 horas previas a la aparición de la peritonitis. \*\* En la "regla 1" se empleaban los mismos factores de riesgo que en la regla 2 pero sin incluir como factor de riesgo el uso de atb de amplio espectro

## ¿SE DEBEN ESTRATIFICAR A LOS PACIENTES?, ¿SON NECESARIOS NUEVOS "SCORES" ESPECÍFICOS DE CANDIDIASIS INVASIVA?

Cada grupo de pacientes muestra peculiaridades muy específicas para el desarrollo de la infección por *Candida* spp [53]. Sin embargo, es muy difícil predecir si va a adquirir una infección fúngica y cuál va a ser su pronóstico considerando la tremenda idiosincrasia entre pacientes. Además, según estudios previos, el 50% de las candidiasis invasivas se producen fuera de las UCIs; lo cual deja obsoleto el uso de los "scores" predictivos, usados en UCI, en otros grupos de pacientes ingresados en otros servicios y hace necesaria la búsqueda de nuevas estrategias predictivas [6, 94, 110].

Varios autores han propuesto modelos de estratificación de pacientes, basándose en los diferentes mecanismos de desarrollo de la candidiasis invasiva que se dan en diferentes grupos de riesgo, **inmunosuprimidos** (paciente onco-hematológico y paciente receptor de TOS), pacientes con **cirugía abdominal de alto riesgo** (peritonitis terciaria, rotura de anastomosis, perforaciones digestivas recurrentes y pancreatitis necrotizante); **otras cirugías abdominales**; pacientes con **otras cirugías y pacientes médicos** [53, 97]. El problema de la estratificación hasta aquí se solventa parcialmente. En subsiguientes etapas, se aplican la búsqueda del polimorfismo de la respuesta inmune en el paciente con sospecha de candidiasis invasiva y "score" clínicos de alto VPN que van a excluir a los pacientes de bajo riesgo y en los que se pretende conocer la dinámica de la colonización de *Candida* spp previa a la candidiasis invasiva. Sin embargo, solo son aplicables a los pacientes de UCIs que llevan varios días ingresados, complicándose esta estrategia en otros servicios de ingreso. En una etapa final, se

consideran los resultados positivos de los biomarcadores biomarcadores de candidiasis invasiva, principalmente el BDG, como guía para iniciar el antifúngico [53, 97, 145].

### 3.2 EL PROBLEMA MICROBIOLÓGICO

Es conocida la baja sensibilidad de los hemocultivos (50%), y de los cultivos microbiológicos en general. Esto se debe básicamente al rápido aclaramiento de las células viables de *Candida* spp de sangre [56, 92].

La presencia de un hemocultivo negativo puede ser reflejo de varias situaciones: i) Ausencia de *Candida* spp viables en circulación; ii) la cantidad de células de *Candida* spp viables estén por debajo del límite de detección de los hemocultivos; y, iii) la presencia de células viables en el torrente circulatorio sea intermitente o transitoria.

En ningún caso los hemocultivos diagnosticarán a aquellos pacientes con candidiasis invasiva sin candidemia asociada, sino únicamente los casos candidemia simple o de candidemia secundaria a una candidiasis profunda.

## **4. EL PROBLEMA TERAPÉUTICO**

Los problemas terapéuticos derivan esencialmente del intento de reducir la mortalidad asociada a la candidiasis invasiva, lo cual está directamente relacionado con el déficit de herramientas diagnósticas que sean lo suficientemente sensibles [146].

Aunque los tratamientos empíricos y anticipados adelantan el tratamiento del paciente a la fase de incubación de la infección por *Candida*, en la mayoría de los casos tiene como resultado una exposición innecesaria de los pacientes a los antifúngicos, con las subsiguientes consecuencias (coste, resistencias, toxicidades) [134].

## 4.1 EL ANTIFÚNGICO

### GENERALIDADES

A pesar de la diferente composición de la membrana celular y de la existencia de una pared celular, ausente en los mamíferos, los hongos son similares a los éstos desde un punto de vista metabólico, dando lugar a la escasez de dianas hongo-específicas.

Los antifúngicos sistémicos se agrupan clásicamente en función del lugar de acción en el hongo y de su mecanismo de acción (tabla 8) [147].

A la hora de seleccionar el tratamiento antifúngico más adecuado la adherencia a las guías clínicas locales e internacionales es vital, por la robustez y evidencia científica de que gozan, siendo fluconazol y equinocandinas los antifúngicos de primera línea [89, 114].

Tabla 8. Clasificación de los antifúngicos según su diana y mecanismo de acción.

Diana	Clase	Mecanismo de acción	Antifúngico
<b>Membrana celular</b>	Azoles	Inhiben la 14 $\alpha$ -desmetilasa	<b>Imidazoles:</b> Ketoconazol, Miconazol <b>Triazoles:</b> Fluconazol, Isavuconazol, Itraconazol, Posaconazol Voriconazol
	Polienos	Unión al ergosterol alterando la permeabilidad de la membrana celular	Anfotericina B
	Alilaminas	Inhiben la escualeno epoxidasa y por tanto, el ergosterol	Terbinafina
<b>Pared celular</b>	Equinocandinas	Inhiben la síntesis del (1,3)-B-D-glucano	Anidulafungina, Caspofungina, Micafungina
<b>Nucleo</b>	Antimetabólito de pirimidina	Inhibe la síntesis de ácidos nucleicos	5-Flucitosina
	Anti-tubulina	Bloquea la tubulina inhibiendo la división celular del hongo	Griseofulvina

Clasificación de los antifúngicos según su lugar y mecanismo de acción. Adaptación de Lewis y col. [147].

Conocer las **peculiaridades farmacocinéticas y farmacodinámicas** del antifúngico son cruciales a la hora de seleccionar el tratamiento adecuado, debiendo considerar la biodisponibilidad por vía oral y la capacidad metabólica y eliminadora de hígado y riñón que podrían comprometer tanto la eficacia como la seguridad del antifúngico seleccionado [147, 148]. Antifúngicos, como la anfotericina B y las equinocandinas, solo se administran por vía intravenosa debido a su escasa biodisponibilidad oral. Los azoles, sin embargo, pueden ser administrados por esta vía, aunque existen variaciones en su absorción; fluconazol y voriconazol presentan una absorción oral >90%.



Otra consideración a tener en cuenta es la **interacción entre fármacos** ya que pueden provocar *fallo terapéutico* por reducción o desaparición del antifúngico de la sangre (ej. triazol y caspofungina con inductores metabólicos); o, podrían provocar *toxicidad de fármacos con estrecho margen* terapéutico (quimioterápicos, inmunosupresores, etc) cuando se administran conjuntamente con inhibidores del citocromo P450 (CYP) [149], como los azoles. El propio antifúngico, además, puede inhibir el metabolismo o la eliminación de otros fármacos; la anfotericina B, nefrotóxica, reduce el aclaramiento o el metabolismo de otros fármacos que se eliminan o que se metabolizan por vía renal (aminoglucósidos, diuréticos potentes, etc) [147, 150].

Se ha de considerar la **biodisponibilidad en el órgano o tejido afectado** (distribución). El SNC y el humor vítreo son lugares de difícil acceso debido al gran tamaño de algunos antifúngicos o a la elevada unión a proteínas plasmáticas; el fluconazol, voriconazol y 5-flucitosina son los antifúngicos que mayores concentraciones alcanzan en estos lugares [151].

La actividad se correlaciona frecuentemente con la dosis del antifúngico y con la CMI del hongo, lo cual puede emplearse como una estrategia que optimice la eficacia antifúngica reduciendo el riesgo de toxicidad; y, además permitiría predecir los sitios de infección donde el antifúngico tiene mayor riesgo de fallo terapéutico debido a que una inadecuada distribución que conduzca a concentraciones inefectivas de antifúngico [147].

Finalmente, a causa de la *variabilidad en los niveles de antifúngicos en sangre* las recientes guías de tratamientos y revisión de expertos han recomendado la **monitorización terapéutica** de alguno de los antifúngicos en poblaciones seleccionadas de pacientes, como el voriconazol o el posaconazol [150, 152].

Tabla 9 .Características de los antifúngicos de uso clínico habitual [147, 148, 150, 152, 153].

Antifúngico	FC/ FD	Toxicidad/ efectos secundarios	Vía adm	Monitorización
<b>Anfotericina B</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Absorción oral &lt;5%</li> <li>- &gt;95% de UPPs</li> <li>- Elevado VD (4L/Kg): altas concentraciones en hígado, bazo, pulmón y riñones. Malas en líquidos pleural, peritoneal, sinovial, LCR (50-60%)</li> <li>- Metabolismo mínimo: parcial hepático (&lt;15%) y orina (4-5%)</li> <li>- t1/2 de hasta 15 días</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Nefrotoxicidad: i) ↓ la FG y alteración de electrolitos; ii) Vigilar la potasemia.</li> <li>- Alteraciones hematológicas: anemia por ↓ de la síntesis de eritropoyetina.</li> <li>- Relacionados con la infusión: fiebre y escalofríos, tromboflebitis con posible necrosis tubular (AnfB&gt; ABCL &gt; ABL).</li> <li>- Hepatotoxicidad</li> <li>- Rash</li> </ul>	IV	No requerido
<b>Fluconazol</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Absorción oral &gt;90%</li> <li>- Escasa UPPs</li> <li>- Alta penetración en líquidos orgánicos ≈ plasmática</li> <li>- Eliminación renal (80% sin metabolizar) Ajustar a la función renal y HFVVC</li> <li>- Vigilar pruebas de función hepática</li> <li>- t1/2: 31hrs</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Escasa toxicidad</li> <li>- Toxicidad gastrointestinal (nauseas, vómitos y diarrea)</li> <li>- Hepatotoxicidad: ↑ de las enzimas hepáticas (raro)</li> <li>- Rash cutáneo</li> </ul>	IV/ Oral	<b>No requerido</b> , salvo en: i) microorganismos con sensibilidad reducida, ii) pacientes con función renal deteriorada y ii) mal cumplimiento
<b>Voriconazol</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- BD oral &gt;90%</li> <li>- Dosis-respuesta no lineal</li> <li>- Metabolismo hepático (CitP450): i) ajustar a la función hepática, ii) múltiples interacciones medicamentosas (CYP)</li> <li>- Eliminación renal: ajustar a función renal: contraindicado para ClCr &lt; 50 mL/min (acumulación de ciclodextrina)</li> <li>- Ajustar al peso del paciente</li> <li>- t1/2: 6 hrs</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Toxicidad ocular (dosis dependiente): fotopsias (30%)</li> <li>- Hepatotoxicidad</li> <li>- Neurológica</li> <li>- Exantema cutáneo, fotosensibilidad, cáncer de células escamosas y melanoma</li> <li>- Toxicidad esqueleto: periostitis, etc</li> <li>- Nefrotoxicidad (¿acumulación de ciclodextrina?)</li> <li>- Otras</li> </ul>	IV/ Oral	<b>Requerido</b> , monitorización del valle en los 4-7 1º días del tto: - > 5 µg/mL: toxicidad - 2-5 µg/mL: óptimo - < 1 µg/mL: ineficaz.
<b>Equinocandinas</b> Caspofungina Micafungina Anidulafungina	<ul style="list-style-type: none"> <li>- BD oral &lt;5%.</li> <li>- UPPs de 84-99%</li> <li>- Metabolismo hepático (ajustar). No se metaboliza la Anidulafungina</li> <li>- Eliminación por heces, salvo Caspofungina que lo hace por orina</li> <li>- t1/2: 15-30 hrs</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Escasa toxicidad. Todas bien toleradas</li> <li>- Relacionados con la infusión</li> <li>- Hepatotoxicidad</li> <li>- Alteraciones gastrointestinales (mica y caspo)</li> <li>- Alteraciones metabólicas (mica)</li> <li>- Cardiovascular: descompensación relacionado con histamina (caspo y anidula)</li> </ul>	IV	<b>No requerido.</b>

## MODALIDADES DE TRATAMIENTO ANTIFÚNGICO

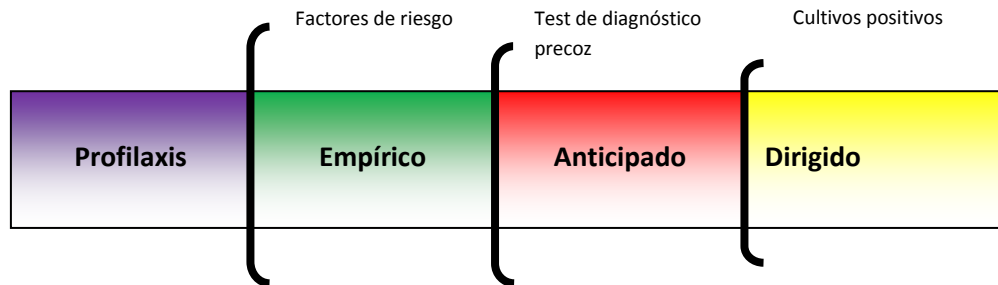


Figura. Diferentes tipos de tratamientos según estado diagnóstico del paciente. Adaptado de Zaragoza y col [154].

### Estrategias de tratamiento.

La **profilaxis** se aplica a determinados grupos de pacientes con muy alto riesgo de infección fúngica (neoplasias hematológicas, trasplante de órgano sólido, determinados pacientes de UCI), los cuales no presentan ni signos ni síntomas de infección, con objeto de evitar el desarrollo de una IFI [89, 100, 114, 131]. El tratamiento **anticipado** es administrado a pacientes con factores de riesgo de desarrollar candidiasis invasiva y uno o varios biomarcadores de candidiasis positivos, como un creciente índice de colonización [136] o la elevación del (1→3)-β-D-glucano [89, 131, 134]. La estrategia de tratamiento **empírico** se administra a aquellos pacientes con factores de riesgo y características clínicas de una posible infección causada por hongos; o, pacientes con cultivos positivos por *Candida* spp previo a la identificación de la especie o a la determinación de la sensibilidad de la misma [131, 134]. Sin embargo, aunque debería considerarse en pacientes con factores de riesgo de candidiasis invasiva y sin otra causa conocida de fiebre, los criterios para iniciar esta modalidad de tratamiento no han sido bien definidos [89]. Hay pocos estudios que

hayan evaluado el impacto de los tratamientos empírico y anticipado. Y nunca han demostrado ser efectivos [134, 155].

El tratamiento **dirigido**, finalmente, se emplea básicamente para ajustar el tratamiento más óptimo a la especie de hongo identificado y también en base a su sensibilidad a los diferentes antifúngicos.

Los tratamientos antifúngicos profilácticos son los más frecuentemente prescritos en oncohematología (40,0%). Los empíricos se prescriben más en los departamentos médicos (42,9%) mientras que los anticipados lo son en las UCIs y en los servicios de cirugía (35,0% cada uno de ellos) y básicamente basándose en los resultados del “*Candida* score”. Finalmente, los tratamientos dirigidos son los más prescritos en los servicios médicos (80,0%) [2].

## 4.2 EL MAL USO DEL ANTIFÚNGICO

En muchos de los casos el antifúngico se prescribe por motivos que no constan en las guías clínicas y se administran sin una prueba definitiva de infección fúngica invasiva [134, 146, 156], a lo cual se suma el importante desconocimiento del manejo del paciente con infección fúngica entre muchos de los clínicos [157].

Según un estudio de Antifungal Stewardship, llevado a cabo en el Hospital Gregorio Marañón, el 57% de las prescripciones de antifúngicos del hospital son inapropiadas, siendo su mayor peso específico el relacionado con los tratamientos empíricos. Las principales razones de esta inadecuación son, ordenadamente: la falta del ajuste microbiológico, y los errores en la selección del antifúngico; la excesiva duración del

tratamiento, la incorrecta la vía de administración, y la errónea dosificación del antifúngico. Además, cabe destacar que la principal indicación para prescribir un antifúngico empírico es la colonización por *Candida* spp [2, 146, 158].

## INADECUACIÓN EN LA SELECCIÓN

### NO SE REQUIERE TRATAMIENTO

Aproximadamente el 7,5% de los pacientes de la UCI son tratados con un antifúngico sistémico, pero entre 65-95% de los pacientes tratados nunca desarrollarán candidiasis invasiva.

Azoulay y col. evaluaron las razones asociadas al tratamiento antifúngico sistémico en el paciente crítico sin candidiasis probada. Los principales criterios que condujeron a una mayor prescripción de un antifúngico sistémico fueron la colonización por *Candida* (OR: 12,4), hospitales de  $\leq 800$  camas (OR: 3,0) y sepsis de origen nosocomial sin documentación microbiológica (OR: 2,1) [146].

Además, la mayor parte de los pacientes tratados con un antifúngico sistémico presentan un “*Candida* score” > 2. Comparando pacientes sin infección fúngica probada, tratados y sin tratar con antifúngico, la mortalidad a los 28 días fue prácticamente igual en ambos grupos (20%), lo cual evidencia la carencia de beneficios del antifúngico en el paciente sin candidiasis [97, 131, 146].

En relación a esto, ya algún autor ha recomendado retirar el tratamiento antifúngico a los 5 días de iniciado si no se documenta la infección por *Candida* spp [154].

## **EL ANTIFÚNGICO PRESCRITO NO ES EL ADECUADO**

El desconocimiento de los aspectos relacionados con la epidemiología, farmacología y manejo del paciente con infección fúngica [147, 157] supone un retraso en el “inicio del correcto tratamiento” resultando en un perjuicio para el paciente. Desgraciadamente, muchos de los pacientes con candidiasis sistémica no reciben el tratamiento correcto hasta que se identifica *Candida* a nivel de especie, lo cual supone una media de 3-5 días. Este hecho podría modificarse parcialmente mediante la adhesión a las guías locales e internacionales de manejo de paciente lo cual permitiría al clínico seleccionar la cobertura antifúngica correcta mejorando, además, el pronóstico de la infección [2, 71, 157-161].

## **LA DURACIÓN DEL TRATAMIENTO ES EXCESIVA**

Aunque en las guías clínicas se recomienda un determinado número de días de tratamiento para los casos de candidiasis invasiva probada, realmente no existe un consenso acerca de la duración del tratamiento, y menos aun ante un paciente con sospecha de candidiasis invasiva [89].

Dada la elevada mortalidad de la candidiasis invasiva, la tendencia en la duración del tratamiento es en la mayoría de las veces “hasta que el paciente esté bien o esté clínicamente estable”, es decir, la duración del tratamiento se prolonga en exceso y, principalmente en los tratamientos empírico y anticipado, llegando hasta un 45% de duración inadecuada [2].

## **LA VÍA DE ADMINISTRACIÓN NO ES LA ADECUADA**

Uno de los errores de los tratamientos antifúngicos es el no cambiar la vía de administración. En aproximadamente el 20% de los tratamientos no se realiza El cambio de la vía intravenosa a la vía oral. Esta inadecuación se pone más de manifiesto en los tratamientos empírico y anticipado [2].

## **4.3 CONSECUENCIAS DEL MAL USO DE ANTIFÚNGICOS**

### **USO DE ANTIFÚNGICOS Y FALSOS NEGATIVOS MICROBIOLÓGICOS**

Uno de los problemas que presenta el uso de los antifúngicos es la producción de falsos negativos en los cultivos microbiológicos. En microbiología se requiere una determinada cantidad de UFC/ml de células viables de cualquier microorganismo para identificar la especie causante de infección y para la determinación de la sensibilidad a los diferentes antimicrobianos.

El uso de antimicrobianos, por otra parte, podría inhibir el crecimiento de los microorganismos en los frascos de hemocultivos lo cual hace necesario el uso de resinas que capturen las moléculas de antimicrobiano.

## **SOBREUSO DE ANTIFÚNGICOS Y EL PACIENTE**

### **TOXICIDAD DE LOS ANTIFÚNGICOS HABITUALES**

Aunque se han mejorado considerablemente los aspectos farmacológicos de los antifúngicos, muchos pacientes se encuentran sometidos a ciclos muy prolongados de



tratamiento, sometiéndoles a una toxicidad a la que no están exentos estos fármacos. Los clínicos deben ser conscientes de la toxicidad de los antifúngicos, ya no solo los relacionados con la dosis (ej. voriconazol), motivo por el que algunos antifúngicos requieren una exhaustiva monitorización [150], sino también de la toxicidad asociada a su uso sistémico durante largo tiempo. Ejemplo de ello lo tenemos en la toxicidad relacionada con la infusión de las equinocandinas, en la nefrotoxicidad de la anfotericina B, en la hepatotoxicidad de los azoles, etc (tabla 9). Además, deben considerarse las posibles interacciones de los antifúngicos con otros fármacos, en la disfunción o insuficiencia renales y hepáticas o en la aparición de reacciones cutáneas y malignidades asociadas con el voriconazol [147, 162-168].

## **RESISTENCIAS A LOS ANTIFÚNGICOS HABITUALES**

Las guías clínicas recomiendan el uso de fluconazol o de una equinocandina como primera línea de tratamiento de la candidemia/ candidiasis invasiva [89, 100, 114]. La resistencia al fluconazol es un motivo de preocupación en el manejo de la candidemia, ya que los pacientes infectados por cepas o especies de *Candida* con altos valores de CMI de fluconazol tienen una mala respuesta al tratamiento [74]. Igualmente, la aparición de cepas resistentes a equinocandinas, principalmente de *Candida glabrata* y *Candida albicans*, es muy problemática [122-124].

Se ha encontrado una correlación entre la exposición previa a azoles y la aparición de cepas de *Candida* spp resistentes a fluconazol, apareciendo tasas de

resistencia del rango de 10-35%. En España esta tasa es inferior al 10%. Este aumento de cepas de *Candida* spp con elevadas CMI's para fluconazol (cepas resistentes y cepas de sensibilidad intermedia /dosis-dependiente), se debe principalmente al aumento de los aislamientos de *Candida glabrata* y a la reducción de los puntos de corte en el CLSI. Sin embargo, por especie, las tasas de resistencia son menores; así, *Candida albicans* resistentes a fluconazol fueron < 2% y de *Candida parapsilosis* < 3.5% [71, 74, 169].

En EEUU recientemente se ha observado la candidiasis abdominal como **reservorio de resistencia a equinocandinas**. Esta se debe a la aparición de mutantes *fks* de *Candida glabrata* y *Candida albicans* vinculado al uso prolongado de equinocandinas que puede dar lugar a infecciones de brecha y a un fallo terapéutico a pesar del control de la fuente [134, 170-172]. En España, aunque no existe este problema (resistencia a equinocandinas < 2%), debe ser vigilado muy estrechamente [74].

## **SELECCIÓN DE CEPAS RESISTENTES DEBIDA A LA PRESIÓN DE ANTIFÚNGICOS**

La presión antifúngica ejercida por el abuso de los tratamientos profilácticos y empíricos han producido un deslizamiento de las especies de *Candida* spp hacia especies de sensibilidad reducida o resistente a los antifúngicos habituales, especies de *Candida*-no *albicans* [71, 134, 173-175]. Así, con la presión ejercida con el fluconazol, en España, hay más frecuencia de aislamientos de *C. glabrata* y de *C. krusei*; y, de igual manera, con la presión ejercida por la Caspofungina han aumentado el número de infecciones por *C. parapsilosis*, *C. glabrata* y *C. krusei* [73].

## USO DE ANTIFÚNGICOS Y GASTO HOSPITALARIO

La media de gasto en materia de antifúngicos en un hospital terciario ronda los 1-3 millones de euros al año [1, 2, 176, 177]. Sin embargo, la candidiasis invasiva y la candidemia llevan asociados gastos directos e indirectos (tabla 10) [178], por lo que, presumiblemente estos gastos podrían ser aún mayores. En un estudio de impacto en 1998 llevado a cabo en EEUU, se estimó que el gasto medio total por paciente estaba entre 34123 \$ y 44536 \$ [72, 179] .

Tabla 10. Gastos directos e indirectos asociados al manejo de la candidemia.

USO DE RECURSOS	Por paciente		Por año	
	PÚBLICO	PRIVADO	PÚBLICO	PRIVADO
Diagnósticos	1.048 \$	1.535 \$	6.627.942 \$	9.708.115 \$
Tratamiento antifúngico	2.406 \$	4.710 \$	15.223.491 \$	29.795.875 \$
Estancia hospitalaria	30.274 \$	37.681 \$	191.510.464 \$	238.370.402 \$
Reacciones adversas a los antifúngicos	6 \$	6 \$	39.103 \$	39.103 \$
Cambio de tratamiento por reacciones adversas a los antifúngicos	389 \$	604 \$	2.462.999 \$	3.818.473 \$
<b>Total</b>	<b>34.123 \$</b>	<b>44.536 \$</b>	<b>215.863.998 \$</b>	<b>281.731.967 \$</b>

Coste total de la candidemia: costes medios (US\$) [179].

La candidiasis invasiva implica un consumo elevado de recursos por hospitalizaciones prolongadas (12.7-15.5 días) y por tratamiento con antifúngicos sistémicos de gran coste económico [72, 178, 180-182].

Todo esto indica la importancia de seleccionar el tratamiento más apropiado y la herramienta más adecuada para diagnosticar e identificar más rápidamente *Candida* spp [183-185].

## **5. BIOMARCADORES: ALTERNATIVAS DIAGNÓSTICAS**

## QUÉ ES UN BIOMARCADOR.

Un grupo de expertos de la NIH (National Institute of Health) definió biomarcadores como *“una característica objetivamente mensurable y evaluable como indicadora de un proceso biológico ordinario, de un proceso patogénico o como respuesta a una intervención terapéutica”* [186, 187].

## CUÁL ES EL BIOMARCADOR IDEAL

Clancy y col. propusieron la idoneidad de los “tests” diagnósticos de candidiasis invasiva [56].

Así, con respecto a la realización de los test, estos deberían:

- Ser no-invasivos o mínimamente invasivos
- Utilizar escaso volumen de muestra
- Dar resultados rápidos y reproducibles
- Requerir una mínima manipulación de muestras y reactivos, y ser asequibles dentro de la rutina del laboratorio de microbiología
- Ser sensibles y específicos
- Dar información de la identificación del hongo y de su sensibilidad a los antifúngicos habituales
- Estar estandarizados

En cuanto a los objetivos de estos test, deberían ser capaces de:

- Discriminar colonización de infección

- Identificar precozmente a aquellos pacientes con candidiasis invasiva
- Identificar aquellos pacientes con candidemia con candidiasis profunda.  
Discriminar el origen de la candidemia
- Identificar aquellos pacientes con candidiasis invasiva profunda y hemocultivos negativos
- Identificar a los pacientes con mal pronóstico o que vayan a tener fracaso terapéutico

## GENERACIONES DE BIOMARCADORES

El diseño de los biomarcadores que diagnostiquen precozmente la candidiasis invasiva y que aporten información sobre el pronóstico del paciente tiene un valor incalculable.

A día de hoy existen tres generaciones de biomarcadores de candidiasis invasiva:

a. **Primera generación: basados en métodos bioquímicos o inmunológicos.** Son las sustancias presentes en sangre y en otros fluidos biológicos cuya determinación se lleva a cabo por métodos serológicos o bioquímicos.

Pueden detectar **antígenos** de la pared celular del hongo o de sustancias secretadas al medio durante su crecimiento (ej. antígenos manano, (1-3)-beta-D-glucano, enolasa, proteinasa aspártica secretada [Saps], etc); **anticuerpos** dirigidos contra determinados antígenos (CAGTA, anticuerpos antimananos, Ab anti Eno1p, etc); o, **metabolitos** producidos por el hongo como el D-arabinitol [188, 189].

Los biomarcadores de esta generación adolecen del bajo rendimiento en sensibilidad y especificidad y para mejorarlo se ha recurrido a la combinación entre varios de estos biomarcadores.

**b. Segunda generación: basados en técnicas de biología molecular, genómicas o transcriptómicas.** Consisten en la amplificación y detección del ADN o del ARN contenida en muestras biológicas mediante técnicas basadas en la PCR o derivados.

El problema que presentan las técnicas de biología molecular es que no solo no mejora la sensibilidad de los hemocultivos en el paciente con candidiasis invasiva sino que además no están estandarizadas.

Dentro de esta generación de biomarcadores se encuentran los microarrays de ADN y de ARN para el diagnóstico rápido de varias especies fúngicas y el cual permitirá detectar la expresión de determinados genes y las resistencias a los antifúngicos habituales [188, 190, 191].

Aunque esta generación de biomarcadores es muy prometedora aun queda un largo camino por recorrer.

**c. Tercera generación: biomarcadores proteómicos o inmunoproteómicos.**

La proteómica actual se basa en la separación de las diferentes proteínas (técnicas basadas en la electroforesis), identificación (MALDI-TOF, T2MR) e interpretación de los datos obtenidos de proteínas (bioinformática).

Los datos obtenidos mediante estas aproximaciones inmunoproteómicas han aportado información acerca de la evolución de la infección invasiva, así como la supervivencia de los enfermos y la respuesta al tratamiento. Además, estos



biomarcadores permiten la identificación de antígenos candidatos para el desarrollo de vacunas o de inmunoterapia [32, 188, 192].

Tabla 11. Generaciones de biomarcadores.

GENERACIÓN DE BIOMARCADORES	CARACTERÍSTICAS
<b>1ª GENERACIÓN</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• MÉTODOS BIOQUÍMICOS/ INMUNOLÓGICOS</li> <li>• Bajo rendimiento si no se combinan. Métodos a pequeña escala.</li> <li>• Técnicas: ELISA (MN y AMN), ensayos cromogénicos (BDG), ensayo turbidométrico, ensayo enzimático-coorimétrico y cromatografía gas-líquido.</li> </ul>
<b>2ª GENERACIÓN</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• TÉCNICAS DE BIOLOGÍA MOLECULAR: amplificación del ADN o basadas en la PCR, RT-PCR, NASBA (amplificación basada en secuencia de ácidos nucleicos)</li> <li>• GENÓMICA/ TRANSCRIPTÓMICA: análisis serológico de genotecas de expresión de ADN genómico y de genotecas de expresión de ADNc recombinante (SEREX).</li> <li>• TRANSCRIPTÓMICA: microarrays de ADN. Permite determinar la expresión de genes, sensibilidad a antifúngicos, etc.</li> </ul>
<b>3ª GENERACIÓN</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• TÉCNICA PROTEÓMICAS/ INMUNOPROTEÓMICAS:</li> <li>• Separación, identificación e interpretación de las proteínas</li> <li>• Análisis del proteoma serológico (SERPA)</li> <li>• MALDI-TOF: técnica de espectrometría de masas con ionización suave. Permite detectar proteínas, péptidos, lípidos,...</li> <li>• T2MR (ambién detectan ADN): basada en resonancia magnética a través de nanopartículas magnéticas.</li> </ul>

## DIANAS DE LOS DIFERENTES BIOMARCADORES: ¿LA CLAVE ESTÁ EN LA PARED CELULAR DE *CANDIDA SPP*?

Las proteínas de la pared celular son importantes factores de virulencia de *Candida spp*. La razón por la que se han utilizado los componentes de la pared celular de *Candida spp* como biomarcadores de candidiasis invasiva es porque se excretan al medio cuando el hongo está en división y crecimiento (antígeno manano y (1 → 3)-β-

D-glucano) o invadiendo (antígeno hpw1). Además, a excepción del (1 → 3)-β-D-glucano, son sustancias fuertemente inmunógenas capaces de producir anticuerpos frente a ellas, anticuerpos antimanano (AMN) y anti-micelio (CAGTA), aportando cierta protección al huésped.

Todos ellos están actualmente comercializados y han sido incluidos en las guías clínicas internacionales de manejo de los pacientes con candidiasis [89, 193, 194].

Los biomarcadores de primera generación son los más empleados actualmente pero poco a poco van siendo relegados o complementados por las técnicas de detección del ADN de *Candida* spp (técnicas de biología molecular) y de proteínas (MALDI-TOF, T2MR), por su baja sensibilidad y especificidad.

La clave “futura” del diagnóstico de las infecciones fúngicas se encuentran en la identificación de las proteínas expresadas por el hongo en un momento dado de la infección.

## BIOMARCADORES BASADOS EN ANTÍGENOS

### A. (1→3)-Beta-D-Glucano (BDG).

Fungitell®; Associates of Cape Cod Incorporated, USA.

El (1 → 3)-β-D-glucano es un polisacárido ubicuo en la naturaleza, y el cual es liberado por el hongo durante la infección.

La técnica está basada en una cinética cromogénica, que consiste en una modificación de la ruta del lisado de amebocitos de *Limulus polyphemus* (LAL) que

produce la liberación final de un cromóforo, la para-nitroanilina (pNA), de un péptido cromogénico artificial, el cual se mide a una longitud de onda de 405 nm.

Es un biomarcador panfúngico, excepto para mucorales y *Cryptococcus* spp, que puede ser determinado tanto en suero como en otras muestras biológicas [195]. Se ha evaluado en LBA, dando muy buenos resultados en el diagnóstico de pneumocystiosis (S: 100%) [196] y siendo comparable al galactomanano para el diagnóstico de la aspergilosis invasiva [197]; y se ha evaluado en LCR para el diagnóstico de meningitis fúngica dando muy buenos resultados, dentro de los cuales se incluyen la buena correlación existente entre la cinética decreciente de BDG y la mejora clínica del paciente [198-200].

En general, la sensibilidad y especificidad del BDG es de moderada a alta (56%-93% y 71%-100%, respectivamente) para el diagnóstico de candidemia en el paciente de UCI, mostrándose superior al *Candida* "score" y al índice de colonización [201, 202]. Si está relativamente bien evaluado en los pacientes ingresados en UCIs, no lo está en otros tipos de pacientes [203]; así, en el paciente hematológico se ha encontrado que la sensibilidad de esta técnica puede ser muy baja, obligando a complementar la técnica con otras herramientas diagnósticas [204].

Sin embargo, lo realmente útil de esta técnica es su elevado VPN, superior al 90%, lo cual permite descartar la presencia de infección fúngica [67, 205].

Como ventaja, el BDG da resultados positivos en un amplio rango de enfermedades fúngicas, siendo excelente en el diagnóstico de la neumonía por *Pneumocystis jirovecii*, y por la rapidez en la obtención de los fácilmente interpretables

resultados [203]. Además, se adelanta a otras técnica diagnósticas a la aparición del hongo en sangre y en algunos casos ha precedido a la fiebre relacionada con la IFI [201, 206].

Sin embargo, dentro del cuadro de sus limitaciones se incluye la baja especificidad por el gran número de falsos positivos que presenta [207-215], algunos de ellos cuestionables como son la presencia de bacteriemias [213, 216, 217] o donde únicamente la albúmina es un potencial falso positivo en el paciente crítico [218], el precio de la técnica y la necesidad de hacer un pool de muestras que obliga a la centralización hospitalaria del BDG [219]. En algunos casos se han apreciado la existencia de falsos negativos [220].

Además de las limitaciones indicadas deben considerarse también las siguientes:

a) Se han empleado diferentes puntos de corte lo cual dificulta la interpretación de los resultados. b) Se deben considerar las diferentes poblaciones sometidas a estudio ya que el valor diagnóstico de la técnica puede variar en función de ésta. c) La sensibilidad y especificidad variará dependiendo de la frecuencia de muestreo. Un muestreo seriado tiende a aumentar la sensibilidad de la técnica (Ellis, M. 2008). d) Se recomienda tener secuenciales resultados negativos con objeto de incrementar el VPN de la técnica. Así mismo test positivos repetidos incrementan igualmente la sensibilidad y la especificidad de la técnica [99]. e) La cinética del BDG aun es desconocida y todavía se desconoce si será capaz de pronosticar la evolución del

paciente, aunque lo que sí parece claro es que a mayores concentraciones de BDG peor pronóstico del paciente con infección [221, 222].

**B. Antígeno Manano (MN)** (comentarios en la siguiente sección).

## BIOMARCADORES BASADOS EN ANTICUERPOS

### A. Anticuerpos Antimicelio (CAGTA)

(*Candida albicans* IFA IgG; VIRCELL MICROBIOLOGISTS, S.L.)

*Candida albicans* Germ tube antibody (CAGTA) se ha desarrollado como técnica de inmunofluorescencia indirecta (IFA) comercializada, que detecta IgG dirigido frente al antígeno hpw1 que se expresa en la pared celular de *Candida* en la forma de hifa. A priori, permite la detección de los anticuerpos antimicelio dirigidos frente a *Candida albicans*, sin embargo, también los detecta procedentes de otras especies, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. krusei*, *C. glabrata*, *C. guilliermondii* o *C. dubliniensis*.

CAGTA ha sido testado en muestras de suero de pacientes de diferentes grupos de riesgo, hematológicos y pacientes críticos no neutropénicos con riesgo de candidiasis invasiva, mostrando altas sensibilidades (84% a 87%) y especificidades (94.7% a 95%) [223-225]. Ha mostrado buenos resultados en el diagnóstico de candidiasis invasiva, incluso en pacientes con hemocultivos negativos [210, 226].

Algunas guías internacionales, de la región de Oriente Medio [227], de diagnóstico y manejo de la candidiasis invasiva ya incluyen el CAGTA como una recomendación diagnóstica englobados dentro de los criterios microbiológicos de candidiasis invasiva probable, ya que la determinación de los anticuerpos antimicelio,

no solamente permite un diagnóstico precoz de la candidiasis invasiva profunda si no que, además permite discriminar infección de colonización [203]. Así mismo, parece prometedor también por el hecho de que permite monitorizar la evolución y/o resolución de la infección debido a la tendencia de negativización del CAGTA en pacientes con buena respuesta terapéutica [224, 228].

Esta técnica tiene sus limitaciones. La falta de aumento significativo de anticuerpos no debe excluir la presencia de una CI en pacientes inmunodeprimidos, donde los títulos son inferiores, o incluso inexistentes Y, al igual que en el resto de los biomarcadores, el resultado de una única muestra no debe ser interpretado como diagnóstico de una infección reciente. Deben recogerse muestras seriadas para aumentar la sensibilidad de la técnica y, siempre complementarse con otros criterios diagnósticos.

#### **B. Antígeno Manano (MN) y anticuerpos Antimanano (AMN)**

(Platelia Candida Ag Plus <sup>™</sup> and Platelia Candida Ab plus <sup>™</sup>, Bio-Rad).

Es una técnica inmunoenzimática tipo sándwich en microplacas (ELISA). La determinación de estos biomarcadores se ha evaluado en suero, plasma y líquido cefalorraquídeo de pacientes con candidiasis invasiva [229].

El antígeno manano es altamente inmunógeno y tiene una fuerte capacidad de producir anticuerpos. La proporción de individuos con anticuerpos antimanano es muy alta. Estos anticuerpos se unen a los antígenos manano cuando se encuentran en circulación sanguínea formando un inmunocomplejo, lo cual podría explicar la corta y

transitoria mananemia en los pacientes con candidiasis invasiva, dando lugar a una baja sensibilidad de la técnica si se usa de forma individual (40-70%) [195].

La liberación del manano de los inmunocomplejos es el paso más crítico de la prueba de detección del Ag. Sin embargo, la detección combinada de MN y AMN incrementa la sensibilidad y especificidad diagnóstica de candidiasis invasiva por encima del 83% y 86%, respectivamente [230]. Ellis y col evaluaron prospectivamente el uso de MN y AMN combinados para el diagnóstico de CI en pacientes hematológicos y mostraron que presentaba un valor predictivo negativo (VPN) superior al 90%, permitiendo excluir la CI y/o monitorizar la resolución de la infección [231]. Al igual que otros biomarcadores de candidiasis invasiva, MN/AMN permite diagnosticar precozmente la infección [203].

La cantidad de MN en sangre varía de una especie a otra de *Candida* spp. Los anticuerpos mAbEBCA-1 usados en esta técnica detectan b-(1-5)-oligosacáridos que no están presentes en todas las especies de *Candida*. El peor rendimiento lo presentan *Candida krusei* y *Candida parapsilosis* [230-234].

Aunque no ha sido muy evaluado, una de las limitaciones más importantes es la falta de reproducibilidad en la detección del MN, lo cual puede ser debido a una degradación de los epítomos del manano por una actividad manosidasa citosólica soluble presente en *Candida albicans* y en humanos [235]. A esta limitación se suma la presencia de falsos positivos y negativos, principalmente en los AMN y el gran número de resultados indeterminados en ambas técnicas.

A pesar de estas limitaciones, la determinación de MN y AMN de forma combinada está recomendada en las guías clínicas europeas para el diagnóstico y manejo de la candidiasis [193].

### C. Otros anticuerpos

Pitarch y col, altamente implicados en la búsqueda de nuevos biomarcadores de candidiasis invasiva, han encontrado un grupo de 5 anticuerpos anti-*Candida* en suero capaces de predecir el pronóstico clínico del paciente con candidiasis, “IC prognosis “score” (“score” pronóstico de candidiasis invasiva). Tres de ellos están asociados a un buen pronóstico de CI y son anticuerpos protectores (**Met6p, Hsp90 y Pgk1p; mediadores anti-apoptosis**) y dos de ellos están asociados al mal pronóstico del paciente siendo marcadores de riesgo (**Ssb1p y Gap1p/Tdh3p; mediadores pro-apoptosis**). Se ha probado en pacientes con candidiasis invasiva probada con buenos resultados [32]. Recientemente este mismo grupo ha publicado que la detección de **IgG anti-Hsp90 + IgG anti-Eno1** en el paciente, no-neutropénico, con sospecha de candidiasis invasiva tenía una S: 78%, E: 97%, VPP: 95%, VPN: 88% y A: 90%. Discrimina bastante bien al paciente con CI del paciente sin ella. Y en el paciente con elevadas concentraciones de IgG anti-Hsp90 ( $\geq 1.2$  RU/mL) permite excluir CI [192].

Krause y col, encontraron que los pacientes con candidemia tenían elevados significativamente los títulos de **IL17A** (citoquina pro-inflamatoria) y de **kinurenina** (implicada en el metabolismo del triptófano). Son buenos candidatos a ser buenos biomarcadores en el diagnóstico precoz de la candidiasis invasiva pues además de



elevarse con el tiempo, discrimina, con una especificidad del 99%, al paciente con CI del paciente colonizado y el sujeto sano [49].

## BIOMARCADORES BASADOS EN LA BÚSQUEDA DE ÁCIDOS NUCLEICOS

### A. Técnica basada en PCR (reacción en cadena de la polimerasa)

Con respecto a los biomarcadores de 1ª generación las técnicas basadas en la PCR han ganado en sensibilidad (no en especificidad) pero, sin embargo, la PCR es equiparable al hemocultivo en el paciente con candidemia [236, 237], disminuyendo la misma ante infecciones probables y posibles [238]. Con respecto a la candidiasis invasiva con hemocultivo negativo, tanto BDG como PCR son más sensibles que el hemocultivo [237].

En el caso de usar esta técnica para hacer un screening en el paciente de alto riesgo con sospecha de candidiasis invasiva, Fortún y col. recientemente han validado una MRT-PCR indicando su utilidad para confirmar, por su alta sensibilidad y VPP, el diagnóstico de CI en el paciente crítico y principalmente en los casos de candidiasis invasiva con hemocultivos negativos [12].

A pesar de que la detección de ADN fúngico es sin lugar a dudas de gran interés, uno de los principales problemas que plantea esta técnica es la interpretación de una gran tasa de resultados positivos [203]. Además, la PCR se mantiene positiva después de la esterilización de los hemocultivos [56].

A parte de lo indicado en el párrafo anterior, esta técnica presenta otras limitaciones como la laboriosidad de la técnica y sensibilidad de la misma a posibles

contaminaciones, la falta de estandarización. Además, hay muy pocos datos de PCR en los pacientes con diferentes grados de colonización por *Candida* spp en cuyo caso podrían implicar una reducción de la especificidad [56].

### **B. Microarrays (de ADN, de proteínas)**

Se define como una matriz bidimensional de material genético, que permite la automatización simultánea de miles de ensayos para conocer en la estructura y el funcionamiento de la dotación genética, tanto de los estados de desarrollo como patológicos del sujeto de estudio. Los microarrays de ADN permiten realizar análisis genéticos diversos basados en la miniaturización de procesos biológicos. Su funcionamiento se basa en la capacidad de las moléculas complementarias de ADN de hibridar entre sí. Se han empleado para la identificación de diferentes géneros y especies de hongos (microarrays de ADN), pero además permite la identificación y expresión de genes en diferentes estadios de la candidiasis invasiva [51, 239], entre ellos determinados genes de virulencia o de resistencia a los antifúngicos habituales [240, 241].

Recientemente, Corrales y colaboradores han empleado CLART STIs B (comercializada por Genómica, Madrid) basada en un multiplex PCR y posterior hibridación con arrays de baja densidad para el diagnóstico de la peritonitis por *Candida* en líquido peritoneal, con una buena concordancia con el gold estándar, S del 93.5% y E del 74.2% [69].

### C. OTRAS TÉCNICAS

Todas ellas se ha diseñado en principio para la identificación de *Candida* spp, bien sobre *Candida* aislada en medio de cultivo o sobre muestra directa, alcanzando sensibilidades del 94->99% [16, 159].

**PNA FISH** (peptide nucleic acid fluorescence in situ hybridization) identifica 5 especies de *Candida* en 1 hora sobre aislamiento de la levadura, **T2MR** (magnetic resonance) basada en técnica de resonancia magnética y que identifica, en un tiempo < 3 horas, las especies de *Candida* en muestra directa sin necesidad de aislar la levadura en medio de cultivo y con un límite de detección de 1-100 UFC/mL según la especie de *Candida*. Esta técnica ha sido recientemente validada en ensayo clínico con muy buenos resultados [13]. **MALDI-TOF** (Matrix-assisted laser desorption/ionization Time-of-flight) identifica todas las levaduras en un espacio de tiempo de 15 minutos, pero para dar buenos resultados debe ser identificado tras aislar la levadura en cultivo [16]. En sangre directa la sensibilidad puede bajar ligeramente, reduciendo la rentabilidad de esta técnica.

## PROTEÓMICA COMO HERRAMIENTAS DIAGNÓSTICA DE LA INFECCIÓN FÚNGICA

La implementación de técnicas proteómicas en la era post-genómica aportan información vital acerca de la complejidad biológica y los patrones de patogenicidad de un microorganismo. Tomando como ejemplo a *Candida albicans*, el análisis de su proteoma ha permitido comprender aspectos acerca de su biología (pared celular,

respuesta a estímulos de estrés) y patogenicidad (virulencia, dimorfismo, etc) dando respuesta a problemas que no pueden ser resueltos por estudios genómicos, y que podrían dar lugar a nuevas herramientas para el manejo de los pacientes con candidiasis invasiva [242]. Recientemente, el conocimiento del perfil de determinadas proteínas en el paciente con candidemia ha permitido pronosticar la evolución del paciente [32]. MALDI-TOF [243], microarrays de proteínas [190, 244], T2MR y otras técnicas son técnicas que permiten la detección e identificación de proteínas.

## **6. PROGRAMAS DE ANTIFUNGAL STEWARDSHIP**

Los programas de antimicrobial stewardship (PROA) se definen como programas multidisciplinarios cuyos objetivos genéricos en los hospitales consisten en: 1) mejorar los resultados clínicos; 2) reducir los efectos adversos relacionados con la utilización de antibióticos, incluyendo la resistencia, y 3) garantizar una terapia coste-efectiva, incluyendo la selección del antimicrobiano apropiado, la dosis correcta, la vía de administración y la duración del tratamiento. Para ello se han implementado una serie de intervenciones para la mejora del uso de antimicrobianos entre las cuales destacan: intervenciones educativas; guías de práctica clínica externa; protocolos y guías locales de tratamiento empírico y dirigido; programas de auditorías (no impositivas) [245]; los cuales son aplicables a la optimización en el uso de antifúngicos [1, 2, 246].

En varios estudios se ha observado un uso inapropiado de antifúngicos de entre el 67-74%, en hospitales terciarios. Un simple cuestionario, entre los adjuntos y residentes de diferentes servicios hospitalarios, ha permitido identificar las debilidades en los conocimientos acerca del manejo de la enfermedad fúngica invasora; debilidades que podrían servir como guía para el diseño de futuros programas de formación en esta materia [2, 157].

## PRIMERA GENERACIÓN DE LOS PROGRAMAS DE AFS: ¿QUÉ SE HA LOGRADO HASTA AHORA?

La implantación de programas de antifungal stewardship basadas en una educación continua e integral de los trabajadores sanitarios podría ser una solución parcial a los problemas asociados con el uso de antifúngicos [2, 246].

Hasta ahora, a través de programas de auditorías basados en recomendaciones sobre el uso de antifúngicos y de programas educativos se ha logrado una reducción sustancial de entre 250000 € a 370000 € al año [1-3]. Estas intervenciones llevadas a lo largo de los periodos de intervención no han menoscabado la calidad asistencial en el paciente con o sin infección fúngica. De ello se deriva que no han aumentado en el número de candidemias, ni se han producido fallos terapéuticos, no han aparecido apenas más resistencias a los antifúngicos habituales, ni ha dado lugar al surgimiento de otras infecciones fúngicas diferentes de *Candida* spp. Además, comparando pacientes de alto riesgo sin candidiasis invasiva probada con y sin tratamiento antifúngico sistémico, la mortalidad ha sido similar en ambos grupos [146].

Por otra parte, la adherencia a las guías clínicas, locales o internacionales, de manejo del paciente con infección fúngica y el conocimiento de la epidemiología local en materia de hongos, es un buen comienzo para reducir el uso inadecuado de antifúngicos por relacionarse estrechamente con factores de riesgo modificables [247].

## SEGUNDA GENERACIÓN DE LOS PROGRAMAS DE AFS. ¿HASTA DÓNDE

### PODEMOS LLEGAR?.

En una segunda generación de Antifungal Stewardship Programs se pretende dar un paso más en la optimización del uso de antifúngicos mediante la introducción de paquetes de medidas basados en dos estrategias complementarias a los Antifungal Stewardship Programs de 1ª generación. Sin embargo, ninguna de las dos medidas han sido evaluadas lo suficientemente, ni validadas con estudios multicéntricos o ensayos clínicos. Estas dos estrategias están basadas en herramientas diagnósticas independientes de cultivo de candidiasis invasiva.

1. **Introducción de test de diagnóstico rápido para *Candida* spp** como herramientas complementarias a las técnicas de identificación tradicionales. Todas las técnicas empleadas han aportado una mejora significativa en el tiempo de prescripción del antifúngico adecuado, así como en una reducción del tiempo de ingreso hospitalario y del coste total [13, 159, 248-250].

Forrest y col, en un estudio con el PNA-FISH (peptide nucleic acid fluorescence in situ hybridization) consiguió un ahorro por el desescalado desde equinocandina a fluconazol de 1729 \$ por paciente [251]. Sin embargo, esta técnica está limitada tanto por el número de especies de *Candida* spp que identifica como por el hecho de que la identificación se efectúa sobre levadura aislada en medio de cultivo.

MALDI-TOF, como método de rápida identificación supera al PNA-FISH por ser capaz de identificar todas las especies de *Candida*, aunque su mejor rendimiento se produce cuando la identificación se realiza sobre levadura aislada en medio de cultivo



[249, 250]. Pérez y col consiguieron con esta técnica diagnóstica una reducción de gasto hospitalario de 45709 \$ a 26162 \$ por episodio [250] y, además, Huang y col redujeron la mortalidad a los 30 días de 20.3% al 12.7% [249].

Aitken et al, compararon tres técnicas de diagnóstico rápido, PNA-FISH, MALDI-TOF y T2 *Candida*, encontrando una importante superioridad de esta última por tratarse de una técnica de pre-cultivo que no necesita el aislamiento de la levadura previamente e identifica la mayor parte de las especies de *Candida*. En menos de 3 horas identifica la mayor parte de las especies causantes de la candidiasis en muestra directa. Con esta técnica diagnóstica se redujo el tiempo de inicio del tratamiento antifúngico correcto a  $0.6 \pm 0.2$  días; y lograron un ahorro de entre 70000 \$ a 140000 \$ por año en un hospital de 500 camas, correspondientes a 306 y 608 dosis menos de equinocandinas. Se mejoró potencialmente el tiempo de inicio del tratamiento cuando se usaban estas técnicas; y, por otra parte, evaluaron las indicaciones de las equinocandinas y la duración del tratamiento con ellas en los pacientes hospitalizados con el fin de interrumpir un tratamiento innecesario, dentro del contexto del desescalado [159].

T2*Candida* ha sido mejorada a T2 MR esta misma técnica usada en sangre completa, con la opción de emplear otros tipos de muestras directas como suero, orina, muestras respiratorias, saliva, etc. y validada en un ensayo clínico [13], presentándose como herramienta prometedora dentro de los ASP.

Sin embargo, este tipo de medidas deben ser evaluadas en estudios prospectivos multicéntricos, dentro del contexto de estos programas.

2. Mediante el **uso de biomarcadores de candidiasis invasiva** (CAGTA, BDG, MN, AMN, detección de ADN de *Candida* spp). Su uso en los Antifungal Stewardship Programs, se basa en el elevado valor predictivo negativo que presentan estas técnicas y principalmente si se emplean en combinación [56, 67]. Varios autores han contemplado estas características; sin embargo, aun no se han evaluado convenientemente con ensayos clínicos multicéntricos para tal finalidad [67, 205, 252, 253].

3. Conjunción de las técnicas de rápida identificación y el uso de biomarcadores de candidiasis invasiva. A día de hoy, no hay datos acerca de la conjunción de estas dos estrategias. Pero, se presentan como herramientas prometedoras en los Antifungal Stewardship Programs.

## **7. ¿EN QUÉ PUNTO ESTAMOS? ¿CUÁLES SON LAS EXPECTATIVAS FUTURAS?**

A estas dos preguntas debemos responder dentro de dos contextos diferentes.

Dentro de un **contexto del diagnóstico precoz** de candidiasis invasiva las limitaciones de los **biomarcadores serológicos** actuales son similares a los "scores" clínicos. Son muy sensibles, recogiendo una cohorte de pacientes muy amplia que reúnen múltiples factores de riesgo de candidiasis invasiva, pero que, sin embargo, la mayor parte de ellos nunca la desarrollarán. Además, los biomarcadores serológicos presentan una gran cantidad de falsos positivos que si bien, muchos de los pacientes, principalmente los pacientes críticos, están sometidos a ellos, la mayoría de las veces son inevitables, comportándose como cortapisa para el verdadero diagnóstico de la candidiasis invasiva y, que haciendo caso a sus resultados favorecen en sobreuso de tratamientos empíricos.

Por otra parte tenemos las **técnicas de diagnóstico rápido**. Aunque no se han evaluado lo suficiente para su uso en los programas de antifungal stewardship son herramientas muy prometedoras ya que resuelven, al menos parcialmente, el excesivo consumo de antifúngicos, permitiendo el ajuste precoz del tratamiento antifúngico, escalando o desescalando según la especie de *Candida* identificada.

Dentro del **contexto de exclusión** de la candidiasis invasiva, los biomarcadores serológicos son más plausibles dentro de este objetivo, dada la escasa tasa de falsos negativos que presentan cuando se usan combinados y que, empleados de manera seriada, permitiría retirar con seguridad un tratamiento innecesario, tras el aval de un ensayo clínico multicéntrico.

## EXPECTATIVAS FUTURAS

Las expectativas futuras en relación con la infección fúngica va encaminado al diagnóstico pronóstico y precoz, y a la nuevas terapias dirigidas, tanto farmacológicas como inmunológicas. Además, se están desarrollando vacunas frente *Candida*. Los avances tecnológicos en materia de diagnóstico son espectaculares aunque aún queda mucho por avanzar y muchas preguntas por responder.



## **8. CARENCIAS DE LA LITERATURA**

Con los biomarcadores comercializados actualmente no se han evaluado varios aspectos que sería necesario analizar:

a. ¿Son capaces de discriminar los orígenes de la candidemia. ¿Qué aportan los biomarcadores a la infección probada?

b. Cómo se comportan los biomarcadores cuando se utilizan en pacientes con candidemia y bacteriemia. ¿Se puede mejorar su poder diagnóstico?

c. Cómo se comportan los biomarcadores de candidiasis invasiva dentro de la sospecha clínica de candidiasis invasiva y en diferentes grupos de riesgo.

d. ¿Podemos monitorizar al paciente con candidiasis invasiva?. ¿Cuál será su pronóstico mediante el uso de los biomarcadores serológicos?.

e. ¿Se pueden emplear los biomarcadores de candidiasis invasiva en programas de Antifungal Stewardship?.



# OBJETIVOS

## OBJETIVO PRINCIPAL

Evaluar la utilidad clínica de los biomarcadores de candidiasis invasiva (1→3)-β-D-glucano (BDG), antígeno manano (MN) y anticuerpos antimanano (AMN) y anticuerpos antimicelio (CAGTA) en pacientes con candidiasis invasiva probada o con sospecha de candidiasis.

## OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Evaluar si los biomarcadores de candidiasis invasiva son capaces de discriminar el origen de la candidemia.
2. Mejorar el poder diagnóstico de los biomarcadores de candidiasis invasiva combinando de varios de ellos y analizando cut-offs alternativos en pacientes con candidemia y bacteriemia.
3. Evaluar la utilidad clínica de los biomarcadores de candidiasis invasiva usados prospectivamente en pacientes con sospecha de candidiasis invasiva que reciben tratamiento antifúngico empírico para la exclusión de la infección.

# MATERIALES Y MÉTODOS

## DISEÑO DE LOS ESTUDIOS

Evaluamos varias pruebas diagnósticas, para lo cual me propongo el cumplimiento de dos objetivos básicos dentro del contexto del **diseño de los estudios**:

1. Valorar el impacto de las técnicas diagnósticas en las posibles decisiones clínicas o en los resultados en pacientes.

2. Conocer la capacidad diagnóstica de las técnicas de forma independiente o en combinación. Me baso en una comparación entre los biomarcadores que se estudian y el gold estándar, aplicados a los pacientes seleccionados, evaluándose los resultados en términos de sensibilidad, especificidad y valores predictivos teniendo en consideración diferentes prevalencias de la infección.

## RETROSPECTIVO

En un primer paso exploramos la utilidad real de los biomarcadores de forma individual y/o en combinación en el marco de pacientes con candidemia probada. Como controles de estos estudios hemos empleado individuos sanos y/o pacientes con bacteriemia.

## PROSPECTIVO

El diseño prospectivo ha permitido dar un paso más en el análisis de los biomarcadores de candidiasis invasiva al considerar situaciones que se presentan de forma habitual en el manejo del paciente hospitalizado con sospecha de candidiasis invasiva. Exploramos el comportamiento de los biomarcadores empleados de forma seriada en pacientes convenientemente estratificados.

## **DESCRIPCIÓN DEL HOSPITAL**

El Hospital Gregorio Marañón sirve a una población de aproximadamente 715,000 habitantes en Madrid, España; y asiste a pacientes de alto riesgo de candidemia (ej., pacientes ingresados en UCIs médicas y quirúrgicas, neonatos, pacientes hematológicos, pacientes con trasplante de órgano sólido, y pacientes con catéteres venosos centrales, entre otros).

## **TIPO DE PACIENTE**

Incluimos pacientes > 18 años, ingresados en cualquier servicio del Hospital General Universitario Gregorio Marañón, con candidiasis invasiva probada y pacientes que hayan iniciado tratamiento antifúngico empírico por sospecha de candidiasis invasiva.

Excluimos mujeres embarazadas y pacientes que no hubieran consentido en participar en ninguno de los estudios.

## **TIPO DE MUESTRA**

Se ha empleado sangre extraída por punción de vena periférica. El suero obtenido tras la centrifugación de la sangre a 3500 rpm durante 10 minutos fue alícuotada y conservada a 4°C, -20°C o -70°C hasta su procesamiento, según el tiempo de espera.

Ningún suero sufrió más de 1 ciclo de congelación-descongelación.

## DEFINICIONES

### *CI PROBADA*

Hemocultivos positivos para *Candida* spp (candidemia) [254] o positividad en los exámenes histopatológicos, citopatológicos o microscópicos de muestras clínicas normalmente estériles obtenidas mediante biopsias o por aspiración con aguja y/o la recuperación de *Candida* spp por cultivo microbiológico de muestras obtenidas por procedimientos estériles de lugares normalmente estériles mostrando además clínica de anomalías radiológicas consistentes en un proceso de enfermedad infecciosa [194].

### *CI PROBABLE*

Sepsis severa sin respuesta al tratamiento antibiótico y colonización multifocal por *Candida* (*Candida* spp aislada de al menos 2 localizaciones no estériles ( $\pm$  3 días)) y/o ITU sintomático por *Candida* spp sin otro diagnóstico microbiológico y/o esofagitis visualizada por endoscopia o por biopsia [255].

### *BACTERIEMIA*

Aislamiento de  $\geq 1$  especie bacteriana de hemocultivo obtenido de vena periférica junto con la presencia de signos y síntomas específicos de sepsis [256].

## TIPO DE CANDIDIASIS INVASIVA

Los pacientes con CI probada fueron clasificados siguiendo las definiciones de Leroy et al del siguiente modo: candidiasis invasiva sin candidemia, candidiasis invasiva con candidemia y candidemia primaria [57].

### CANDIDIASIS INVASIVA SIN CANDIDEMIA

Recuperación de *Candida* spp por cultivo microbiológico de muestras obtenidas por procedimientos estériles de lugares normalmente estériles mostrando además clínica y anormalidades radiológicas consistentes en un proceso de enfermedad infecciosa pero con hemocultivos negativos [145].

### CANDIDIASIS INVASIVA CON CANDIDEMIA

Al menos un hemocultivo positivo para *Candida* spp y otra muestra con el mismo aislamiento de *Candida* spp procedente de una muestra habitualmente estéril, relacionado con un lugar específico de infección [57].

Aceptamos como **candidemia** con **candidiasis invasiva probable** los pacientes con candidemia y documentación clínica en el lugar de la infección pero sin confirmación microbiológica de *Candida* spp y sin ninguna otra etiología, ej., pacientes con coriorretinitis o infección intraabdominal [225].

### CANDIDEMIA PRIMARIA/ CANDIDEMIA RELACIONADA CON EL CATÉTER

Al menos un hemocultivo positivo para *Candida* spp sin ningún foco específico de infección [57].

Candidemia relacionada con el catéter, cuando la especie de *Candida* aislada en hemocultivo de sangre extraída por vena periférica y la especie de *Candida* aislada en el cultivo de catéter es igual [89].

## BIOMARCADORES EVALUADOS

### **Determinación serológica de *Candida albicans* Germ Tube Antibody (CAGTA).**

Los sueros fueron diluidos (1:4) con tampón fosfato salino (PBS); a 20 µl de la solución resultante se le agregaron 80 µL de sorbente (alícuotas de *Candida albicans* en fase levaduriforme) para lograr una dilución 1:20 de la muestra. 20 µL de esta solución fue depositada en cada pocillo del portaobjetos, en los cuales hay fijados antígenos de *Candida albicans* en su fase micelial. Posteriormente se agregaron anticuerpos IgG antihumanos marcados con fluoresceína. Las muestras fueron interpretadas como positivas si se observaba en la fase micelial fluorescencia verde y las blastoconidias (fase levaduriforme) se observaban de color rojo. Las muestras positivas fueron diluidas para obtener su título, considerándose finalmente como positivas aquellas que tuvieran títulos  $\geq 1/160$ .

### **Determinación serológica de los antígenos manano (MN) y anticuerpos anti-mananos (AMN).**

Se emplearon los kits comerciales Platelia *Candida* Ag Plus y Platelia *Candida* Ab Plus. Las determinaciones de MN y ANM fueron automatizados en el EVOLIS<sup>TM</sup> Twin Plus (Bio-Rad, Marnes-la-Coquette, Francia) siguiendo las instrucciones del fabricante.



Los cut-offs recomendados fueron los siguientes: MN, positivo  $\geq 125$  pg/mL, indeterminado  $< 125$  pg/mL-62.5 pg/mL, negativo MN  $< 62.5$  pg/mL; AMN, positivo  $\geq 10$  AU/mL, indeterminado  $< 10$  AU/mL-5 U/mL, y negativo  $< 5$  U/mL.

### **Determinación serológica de (1-3)-beta-D-glucan (BDG).**

La técnica de Fungitell® fue automatizado en el lector de microplacas BIOTEK ELX808TM y empleando el software GEN5; BIOTEK U.S., Vermont, EEUU.

Los cut-offs propuestos por el fabricante fueron los: positivo  $\geq 80$  pg / mL, indeterminado  $\geq 62$  pg / mL -  $< 80$  pg / mL, negativo  $< 62$  pg / mL).

## **RECOGIDA DE DATOS**

Los datos demográficos, clínicos y microbiológicos se recogieron siguiendo los protocolos pre-establecidos para efecto de cada estudio en Access 2007 (Microsoft® Office 2007).

## **ANÁLISIS ESTADÍSTICO**

Para el análisis estadístico se emplearon los paquetes **SPSS versión 20.0** (IBM, SPSS Statistic; Armonk, New York) y **EPIDAT 3.1** (Xunta de Galicia, Consellería de Sanidade, Dirección Xeral de Saúde Pública y Organización Panamericana de la Salud, oficina regional de la OMS).

## **ASPECTOS ÉTICOS Y LEGALES**

### **ESTUDIOS RETROSPECTIVOS**

La Fundación para la Investigación Biomédica del Hospital Gregorio Marañón (FIBHGM) fue el promotor del estudio (ref. EONC001-2012). Fue aprobado por el comité ético local, Comité Ético de Investigación Científica del Área 1 (CEIC-A1) del Hospital General Universitario Gregorio Marañón, Ref. 350/12; y, previamente aprobado y clasificado por la Agencia Española del Medicamento y Productos Sanitarios. Fue concedida la exención de consentimiento informado para las muestras de archivo por el mismo CEIC-A1.

### **ESTUDIO PROSPECTIVO**

La Fundación para la Investigación Biomédica del Hospital Gregorio Marañón (FIBHGM) fue el promotor del estudio (ref. EONC002-2013). Fue aprobado por el Comité Ético local (CEIC-A1, ref. 247/13) posteriormente a su clasificación por la Agencia Española del Medicamento y Productos Sanitarios (AEMPS).

Tabla 11. Resumen de los estudios incluidos dentro de esta tesis.

Diseño	Periodo de estudio	Nº de pacientes incluidos	Muestra	Tipo de paciente	Entidad estudiada	BMs	Criterios de inclusión	Objetivo	Publicaciones asociadas
R	2003-2012	100	Suero de archivo de $\leq$ 48 horas de HC positivo	Paciente ingresado en HGUGM	CM (50) SS (50) control	CAGTA	>18 años, no embarazada, con CM probada. Sujetos sanos (consentimiento)	Evaluar el papel de CAGTA en la discriminación del origen de la CM	[225]
R	2012-2014	81	Suero de archivo de $\leq$ 48 horas de HC positivo	Paciente ingresado en HGUGM	CM (31)/ BM (50) control	CAGTA MN/AMN BDG	>18 años, no embarazada, con CM y BM (consentimiento) probadas.	Analizar el rendimiento de 4 BMs de CI en la exclusión de CM usando los cut-offs recomendados por los fabricantes y analizando cut-offs alternativos.	[257]
P	2012-2014	100	Sueros extraídos los días 0, +3 y +5 de inicio de antifúngico empírico	Paciente ingresado en HGUGM con tratamiento empírico por sospecha de CI	Sospecha de CI	CAGTA BDG	>18 años, no embarazadas, no hematológico con antifúngico empírico por sospecha de CI y firme consentimiento informado. Se excluyen: CI probada en el momento de la inclusión, antifúngico previo (> 5 días), u otras IFIs distintas de CI.	Evaluar BMs solos y combinados en sueros extraídos los días 0, +3 y +5 de iniciado antifúngico empírico en la exclusión de CI en pacientes con sospecha de CI.	JAC-2015-0408 (Under Review)

R: retrospectivo; P: prospectivo. BMs: biomarcadores. CM: candidemia. CI: candidiasis invasiva. BM: bacteriemia. CAGTA: Candida albicans germ tube antibody. MN: antígeno manano. AMN: anticuerpos antimanos. BDG: (1,3)-beta-D-glucano.

# RESULTADOS

A partir de este punto la tesis se estructura en apartados que se responden a las preguntas de investigación.

# **OBJETIVO 1**

**Evaluar si la determinación del  
*Candida albicans* Germ Tube Antibody  
(CAGTA) es capaz de discriminar el origen  
de la candidemia**

## INTRODUCCIÓN

Los pacientes con candidiasis invasiva pueden enmarcarse dentro de tres tipos infección: candidemia transitoria asociada o no a catéter, candidemia asociada a infección de órganos profundos y candidiasis invasiva sin candidemia asociada [56, 237].

La distinción clínica de estas entidades no llega a ser evidente por los métodos microbiológicos ni de imagen convencionales. La estratificación de los pacientes en función del tipo y/o categoría de infección guiados por biomarcadores serológicos podrían llegar a ser de gran utilidad en los estudios de extensión a los que se someten los pacientes con candidemia así como en el screening de la duración del tratamiento antifúngico.

La detección de un CAGTA positivo sugiere una candidiasis asociada a invasión de órganos y tejidos profundos en los cuales las hifas de *Candida* spp se encuentran invadiendo [258, 259]. Las hifas contienen el antígeno hpw1 que promueve la producción de CAGTA [36, 260].

Nuestra hipótesis es que los pacientes con candidemia y CAGTA positivo deben ser considerados como pacientes con candidiasis invasiva asociado a una infección profunda.

## MATERIALES Y MÉTODOS

Fueron incluidos un total de 50 pacientes con diagnóstico de candidemia, del periodo comprendido entre los años 2003 y 2012. Todos los pacientes tuvieron al menos una muestra de suero extraído dentro de las 48 horas del diagnóstico de candidemia (primer hemocultivo positivo). Se obtuvieron también muestras de suero de 50 individuos sanos. Las muestras fueron conservadas a -70°C hasta su procesamiento.

Las especies de *Candida* fueron identificadas usando ID 32C (BioMérieux, Marcy l'Etoile, Francia).

Las características clínicas de los episodios fueron obtenidas de las bases de datos de hemocultivos, y todos los casos fueron revisados de acuerdo a un protocolo previamente establecido. En el mismo protocolo se recogió la información demográfica y las enfermedades de base subyacentes de cada paciente.

### *Detección serológica de CAGTA*

Los sueros fueron procesados siguiendo las instrucciones del fabricante (Vircell Microbiologist S.L., Granada, Spain). El punto de corte fue establecido en  $\geq 1/160$ , como está recomendado.



### *Análisis estadístico*

Se compararon los pacientes diagnosticados de candidemia con infección profunda (DSC) y sin infección profunda (no-DSC). Se empleó el test exacto de Fisher para evaluar la correlación entre CAGTA positivo y el diagnóstico de DSC.

Se calcularon sensibilidad (S), especificidad (E), valor predictivo positivo (VPP) y valor predictivo negativo (VPN) y la exactitud diagnóstica (A) de CAGTA para el diagnóstico de DSC. Se consideró estadísticamente significativo un valor de  $P < 0.005$ .

Los datos recopilados fueron introducidos en Access 2007, y el paquete estadístico SPSS 16.0 (IBM, SPPS Statistic; Armonk, New York) fue usado para el análisis estadístico.

## RESULTADOS

Las características demográficas y clínicas se muestran en la **tabla 1**.

La edad media de la población general fue de  $64.6 \pm 15.6$  años. La principal enfermedad de base fue la gastrointestinal (52%) seguido de los tumores sólidos (40%). Los factores de riesgo de candidemia fueron el uso de catéteres intravasculares (96%) seguido de NPT (40%), entre otros.

Las especies de *Candida* más frecuentemente aisladas fueron *Candida albicans* (40%) y *Candida tropicalis* (20%).

Del total de los pacientes con candidemia, un 46% murieron durante el ingreso.

De los 50 episodios de candidemia, 21 (42%) fueron clasificados como no-DSC, incluyendo 16 (76.2%) candidemias relacionadas con el catéter y 5 (23.8%)

candidemias primarias. Las restantes 29 (58%) candidemias fueron clasificadas como DSC. La mayoría de las DSC estuvieron asociadas a una infección intraabdominal (14) o a una infección del tracto urinario con obstrucción (8). Otros lugares implicados en las candidemias asociadas a infecciones profundas fueron: 3 infecciones endovasculares, 2 coriorretinitis, 2 celulitis perianales en pacientes neutropénicos y 1 caso de cada uno de los siguiente: meningitis, empiema osteomielitis vertebral y una candidiasis invasiva diseminada a piel. Cuatro de los pacientes tuvieron más de un órgano afectado.

16 DSC fueron demostradas microbiológicamente (55.2%) y 13 clínicamente (1 endocarditis no operable, 1 coriorretinitis, 1 sepsis urinaria y 10 candidiasis intraabdominal) en los cuales ninguna muestra clínica fue enviada a microbiología.

En general, CAGTA fue positivo en 21/50 muestras de suero obtenidas dentro de las 48 horas del diagnóstico de la candidemia (42%): 1/21 fue no-DSC y 20/29 fue DSC (4.76% vs 68.96%;  $p<0.01$ ) (**Tabla 2**). Consecuentemente, los valores diagnósticos (IC de 95%) de un simple CAGTA positivo, para confirmar DSC fueron: sensibilidad, 68.97% (49.05%-84.02%); especificidad, 95.24% (74.13%-99.75%); valor predictivo positivo, 95.24% (74.13%-99.75%); valor predictivo negativo, 68.97% (49.05%-84.02%) y precisión diagnóstica, 80% (65.86%-89.50%).

Tabla 1. Características de los 50 pacientes con candidemia asociada a infección profunda (DSC) y no asociada a infección profunda (no-DSC).

	TOTAL (n=50)	No-DSC (n=21)	DSC (n=29)	P
Sexo (Hombre)	27 (54%)	13 (62%)	14 (48%)	0.340
Edad media (años)	64.64 ± 15.9	66 ± 13.6	63.6 ± 17.6	0.423
Servicio de ingreso				
Quirúrgico	24 (48%)	10 (47.6%)	14 (48.3%)	0.963
Médico	15 (30%)	6 (28.6%)	9 (31%)	0.851
Onco-hematológico	9 (18%)	4 (19%)	5 (17.2%)	0.870
UCIs	2 (4%)	1 (4.8%)	1 (3.4%)	0.815
Enfermedad de base				
Gastrointestinal	26 (52%)	9 (42.9%)	17 (58.6%)	0.271
Tumor sólido	20 (40%)	7 (33.3%)	13 (44.8%)	0.413
Hepática	14 (28%)	7 (33.3%)	7 (24.1%)	0.475
Genito-urinaria	10 (20%)	3 (14.3%)	7 (24.1%)	0.390
Cardiovascular	10 (20%)	5 (23.8%)	5 (17.2%)	0.567
Insuficiencia renal	10 (20%)	3 (14.3%)	7 (24.1%)	0.390
Diabetes	8 (16%)	5 (23.8%)	3 (10.3%)	0.200
Cáncer hematológico	7 (14%)	4 (19%)	3 (10.3%)	0.381
Pulmonar	6 (12%)	3 (14.3%)	3 (10.3%)	0.672
TMO	2 (4%)	1 (4.8%)	1 (3.4%)	0.815
VIH	2 (4%)	0 (0%)	2 (6.8%)	0.219
TOS	1 (2%)	1 (4.8%)	0 (0%)	0.235
Días de ingreso hospitalario hasta el diagnóstico de candidemia (media ± SD)	21 ± 51.7	23 ± 70.8	18 ± 27.9	0.274
Factores riesgo de candidiasis				
Catéter intravascular	48 (96%)	21 (100%)	27 (93.1%)	0.219
Cirugía	26 (52%)	9 (42.9%)	17 (58.6%)	0.271
Sonda urinaria	23 (46%)	11 (52.4%)	12 (41.4%)	0.441
Nutrición parenteral total	20 (40%)	9 (42.9%)	11 (37.9%)	0.726
Ventilación mecánica	15 (30%)	8 (38.1%)	7 (24.1%)	0.288
Cirugía abdominal	13 (26%)	4 (19%)	9 (31%)	0.340
Inmunosupresión	11 (22%)	5 (23.8%)	6 (20.7%)	0.793
Hemodiálisis	9 (18%)	6 (28.6%)	3 (10.3%)	0.098
Candida spp.				
<i>C. albicans</i>	20 (40%)	6 (28.6%)	14 (48.3%)	0.160
<i>C. tropicalis</i>	10 (20%)	4 (19%)	6 (20.7%)	0.886
<i>C. parapsilosis</i>	9 (18%)	6 (28.6%)	3 (10.3%)	0.098
<i>C. glabrata</i>	6 (12%)	2 (9.5%)	4 (13.8%)	0.647
<i>C. krusei</i>	3 (6%)	1 (4.8%)	2 (6.9%)	0.754
<i>C. lusitaniae</i>	1 (2%)	1 (4.8%)	-	0.235
<i>C. albicans</i> + <i>C. glabrata</i>	1 (2%)	1 (4.8%)	-	0.235
Origen de la candidemia				
Catéter	19 (38%)	16 (76.2%)	3 (10.3%)	<0.01
Primario	9 (18%)	5 (23.8%)	4 (13.8%)	0.363
Urinario	6 (12%)	-	6 (20.7%)	0.026
Intraabdominal	10 (20%)	-	10 (34.5%)	0.003
Otros*	6 (12%)	-	6 (20.7%)	0.026
Mortalidad total	23 (46%)	10 (47.6%)	13 (44.8%)	0.845
Mortalidad relacionada (0-7 días)	12 (24%)	5 (23.8%)	7 (24.1%)	0.979

\* Otros orígenes: celulitis perianal en paciente neutropénico (n=2), endocarditis (n=2), meningitis (n=1), empiema (n=1).

La proporción de los CAGTA positivos en los pacientes con DSC fue similar en los casos probados tanto clínica como microbiológicamente (69.2% vs 68.8%). La sensibilidad y especificidad de CAGTA para la discriminación de la DSC en las candidemias causadas por las especies más prevalentes de *Candida* spp fueron las siguientes: *Candida albicans*: sensibilidad 85.7% (95% CI 56.1%-97.5%), especificidad 83.3% (95% CI 56.5% -99.1%); *Candida tropicalis*: sensibilidad 33.3% (95% CI 6% - 75.9%), especificidad 100% (95% CI 39.6% -97.6%), *Candida parapsilosis*: sensibilidad 100% (95% CI 62.9% -99%), especificidad 100% (95% CI 56.1% -97.5%); y *Candida glabrata*: sensibilidad 75 % (95% CI 21.9% -98.7%), especificidad 100% (19.8% -95.1%) (Tabla 2).

El paciente clasificado como no-DSC con un falso positivo del CAGTA correspondió a un varón de 53 años diagnosticado de Púrpura Trombocitopénica Idiopática después de sufrir un ictus. El paciente estaba recibiendo rituximab. Requirió múltiples ingresos en la UCI, plasmaféresis y una duración de ingreso de seis meses. Solo pudimos demostrar una candidemia relacionada con el catéter (cultivos de la punta de catéter y de los hemocultivos rindieron *C. albicans*), por la imposibilidad de excluir otros lugares de infección debido a su condición terminal.

Los nueve pacientes diagnosticados de DSC y con falsos negativos en el resultado de CAGTA correspondieron a cinco pacientes inmunodeprimidos (2 VIH y 3 pacientes hematológicos), 3 pacientes con tumores sólidos (1 hepatocarcinoma y 2 cánceres gástricos) y 1 paciente con diabetes mellitus avanzada y portador de sonda vesical permanente que le produjo un trauma por manipulación accidental.

Tabla 2. Resultados de CAGTA en la muestras de suero de 50 pacientes con candidemia. CAGTA se muestra para la totalidad de *Candida* spp de los pacientes con candidemia asociado a candidiasis profunda (DSC) y candidemia sin candidiasis profunda (no-DSC) así como para las *Candida* spp más prevalentes.

	Candidemia	CAGTA +	CAGTA -	P
<b>Todas las especies</b>	DSC	20 (68.9%)	9 (31.0%)	<0.001
	No-DSC	1 (4.7%)	20 (95.2%)	<0.001
<b><i>C. albicans</i></b>	DSC	12 (85.7%)	2 (14.3%)	0.060
	No-DSC	1 (16.7%)	5 (83.3%)	0.105
<b><i>C. tropicalis</i></b>	DSC	2 (33.3%)	4 (66.7%)	0.034
	No-DSC	0 (0.0%)	4 (100%)	0.619
<b><i>C. parapsilosis</i></b>	DSC	3 (100%)	0 (0%)	0.220
	No-DSC	0 (0%)	6 (100%)	0.517
<b><i>C. glabrata</i></b>	DSC	3 (75.0%)	1 (25.0%)	0.779
	No-DSC	0 (0.0%)	2 (100%)	0.740

Los falsos negativos de CAGTA estuvieron significativamente asociados a inmunosupresión (83.3% vs 17.4%,  $p<0.01$ ), severidad de la enfermedad de base como se refleja en el "score" de Pitt ( $4\pm3.8$  vs  $1.9\pm2$ ,  $p=0.06$ ), necesidad de ventilación mecánica (71.4% vs 19.2%,  $p=0.008$ ) y candidemia causadas por *C. krusei* o *C. tropicalis* (75% vs 14.3%,  $p=0.004$ ).

La mortalidad total fue similar tanto en los pacientes con CAGTA negativo como positivo: 48% vs 43%,  $p=0.70$ . Sin embargo, la mortalidad temprana (primeros 7 días)

fue superior en los pacientes con CAGTA negativo (34.5% vs 9.5%;  $p=0.04$ ). No encontramos una clara asociación entre los títulos de CAGTA y la mortalidad: CAGTA negativo: 14/29 (48.3%), 1/160: 3/9 (33.3%), >1/160: 6/12 (50%);  $p=0.70$ . Los porcentajes de mortalidad temprana en los pacientes con distintos títulos de CAGTA fueron los siguientes: CAGTA negativo (<1/160): 34.5%, 1/160: 0%; >1/160: 16.7%;  $p=0.08$ .

### Grupo control

La edad media de los 50 sujetos sanos incluidos fue de  $38.5 \pm 11.6$  años siendo 16 (32%) hombres. Ninguno de ellos mostró infección activa por ningún microorganismo en el momento del estudio, a excepción de una paciente que refirió vaginitis recurrente por *Candida* spp. En todos los casos los CAGTAs fueron negativos ( $\leq 1/20$ ).

## DISCUSIÓN

Nuestros datos muestran que un CAGTA positivo en los pacientes con candidemia es muy sugestivo de candidiasis invasiva profunda lo cual podría tener implicaciones diagnósticas y terapéuticas.

Recientes estudios han propuesto la clasificación de las candidiasis invasivas dentro de tres entidades diferentes: (1) candidemia sin candidiasis invasiva profunda asociada; (2) candidemia asociada a candidiasis invasiva profunda; y (3) candidiasis invasiva profunda sin candidemia asociada. En un reciente estudio realizado en UCIs francesas el 39.5% de los pacientes fueron clasificados dentro del grupo de candidemia sin candidiasis invasiva asociada, 28.4% como candidemia con candidiasis invasiva y

32.1% como candidiasis invasiva sin candidemia relacionada [57]. Considerando la baja sensibilidad de los hemocultivos, en torno al 50%, en el diagnóstico de la candidiasis invasiva, el papel de los métodos diagnósticos independientes del cultivo será capaz de encuadrar la mitad de las candidiasis invasivas dentro del grupo de candidemia con y sin candidiasis invasiva asociada [56]. La distinción de estas entidades puede complicarse si las manifestaciones clínica son inespecíficas o cuando está contraindicada la toma de muestras. Por otra parte, los cultivos de muestras clínicas profundas podrían resultar negativas después de varios días de tratamiento antifúngico. La identificación de los pacientes con DSC es de crucial importancia ya que podrían requerir tratamientos antifúngicos más prolongados o cirugía, y, en definitiva, de un manejo más radical. La potencial importancia de estos test diagnósticos dentro de este contexto ha sido enfatizada en un reciente estudio por Nguyen et al [237]. Se compararon hemocultivos, BDG y RT-PCR cuantitativa en una población en la cual el 60% de los casos fueron diagnosticados como candidiasis invasiva sin candidemia asociada. Tanto RT-PCR como el BDG fueron significativamente superiores en sensibilidad a los hemocultivos en los pacientes con candidiasis invasiva (88% y 62% vs 17%, respectivamente). En la década de los noventa, Girmenia et al informaron que una manoproteína estaba presente en el 7% de los pacientes con candidemia transitoria o en las relacionadas con catéter, y en el 76% de los pacientes con candidemias persistentes o con candidiasis invasiva [261]. Creemos que en un futuro cercano la proporción de pacientes con candidiasis invasiva sin candidemia será superior con el uso de estas nuevas técnicas diagnósticas.

CAGTA es una inmunofluorescencia que detecta anticuerpos dirigidos contra el antígeno de la fase micelial de *C. albicans* - hwp1 – que es esencial para el desarrollo de biofilm y para la invasión de tejidos [262-264]. Aunque esta técnica inicialmente se diseñó para *Candida albicans*, se ha demostrado que otras especies de *Candida* como *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. glabrata*, *C. dubliniensis*, *C. guilliermondii*, y *C. krusei* también son capaces de producir CAGTA en mayor o menor grado [258, 265]. En nuestra experiencia, la precisión de CAGTA fue similar en todas las especies de *Candida*, con la excepción de *C. tropicalis* que presentó menor sensibilidad (33%), reteniendo una especificidad del 100%. Este hallazgo requiere ser investigado. CAGTA produjo una S del 75% con un 100% de E para las candidemias producidas por *C. glabrata*. Aunque en *Candida glabrata* no se ha demostrado aun la producción de hifas, si que se ha visto que puede producir pseudohifas lo cual podría contribuir a la positividad del resultado de CAGTA [266]. Un CAGTA positivo es además sugestivo de enfermedad invasiva causada por alguna de estas especies.

Diferentes cut-offs se han sugeridos según el tipo de paciente; así, 1/20 se ha recomendado en los pacientes hematológicos y 1/160 para el resto de los pacientes [223, 263]. Una ventaja de esta técnica con respecto a otras técnicas diagnósticas independientes de cultivo es su precio reducido (aproximadamente 10€ por determinación), y a su relativa rapidez en la obtención de resultados (3 horas en total, con 20 minutos de manipulación de muestras y productos).

La experiencia clínica de este test es todavía escasa y ningún estudio publicado hasta ahora ha correlacionado la producción de CAGTA con el origen de la candidemia



o con la extensión de la infección a otros lugares. Pemán y colaboradores han sugerido que las determinaciones sistemáticas de CAGTA en suero de pacientes críticos con riesgo de candidiasis invasiva es un buen marcador para la administración de antifúngico empírico [224]. También podría ser útil para la monitorización de la respuesta al tratamiento en este grupo de pacientes [267] e incluso podría ayudar en la predicción de la evolución de los pacientes. En nuestra serie, la mortalidad fue similar en pacientes con o sin DSC candidemia (47% y 44%, respectivamente). Estos resultados concuerdan con los de Leroy et al, que informó la muerte del 47.7% entre los pacientes con candidemia sin candidiasis invasiva, del 48.7% en los pacientes con candidemia relacionada a candidiasis invasiva y el 41% en los pacientes con candidiasis invasiva sin candidemia asociada [57]. Sin embargo, los pacientes con mortalidad temprana (0-7 días) normalmente tuvieron el CAGTA negativo. Otros autores encontraron también que la mortalidad intra-UCI era menor en aquellos pacientes que tuvieron CAGTA positivo [224, 267, 268].

En futuros estudios, se deberá de establecer el papel de CAGTA en aquellos pacientes con candidiasis invasiva sin candidemia asociada, así como la funcionalidad del mismo en pacientes inmunodeprimidos en los cuales se ha observado una mayor proporción de resultados falsos negativos.

## CONCLUSIONES

Un CAGTA positivo en el paciente con candidemia puede sugerir la presencia de candidiasis invasiva asociada a candidemia. En estas circunstancias, serían necesarios los estudios de extensión y la búsqueda de otros orígenes diferentes del catéter.

También sería necesario evaluar las implicaciones clínicas de este hallazgo y evaluar su potencial utilidad en la definición de la duración óptima del tratamiento.

Son necesarios estudios prospectivos que incluyan mayor tamaño muestral, muestras seriadas y la combinación de CAGTA con otras técnicas diagnósticas independientes de cultivo.

## LIMITACIONES

Este estudio presenta varias limitaciones. Primero, es un estudio retrospectivo en el cual CAGTA fue analizado en un único suero, por lo que el test no pudo ser evaluado para el screening de la infección o la respuesta al tratamiento. Segundo, el tamaño muestral es pequeño. Sin embargo, es la primera vez que la determinación de CAGTA en suero es utilizado para discriminar o conocer la extensión de la infección de tejidos profundos en pacientes con candidemia.

## **OBJETIVO 2**

**Mejorar el poder diagnóstico de los biomarcadores de candidiasis invasiva mediante su combinación y el análisis de cut-offs alternativos en pacientes con candidemia y bacteriemia para la exclusión de la candidemia.**

## INTRODUCCIÓN

El tratamiento empírico precoz en pacientes con sospecha de candidiasis invasiva sin duda afecta a la supervivencia del paciente [269] y a día de hoy representa un tercio de las prescripciones de antifúngicos en la mayor parte de los hospitales [1, 2]. La selección de aquellos pacientes que se van a beneficiar de este tipo de tratamiento se basa principalmente en "score" clínicos de predicción, los cuales están diseñados para pacientes críticos no-neutropénicos [97]. Sin embargo, dado el bajo valor predictivo positivo (VPP) de estos "score", muchos pacientes reciben innecesariamente antifúngicos, caros y algunos no exentos de toxicidad.

Solo la mitad de los pacientes con candidiasis invasiva presentan hemocultivos positivos [56], y el diagnóstico microbiológico, por regla general, es confirmado a los 2-5 días de recogidos los hemocultivos [270]. Las nuevas técnicas diagnósticas de candidiasis invasiva basados en técnicas de no-cultivo incluyen *Candida albicans* Germ Tube Antibody (CAGTA), Platelia *Candida* Ag manano (MN) and Ac anti-mananos (AMN), y (1→3)-beta-d-glucano (BDG). Estas técnicas han sido empleadas de forma independiente y en poblaciones seleccionadas para el diagnóstico de candidiasis invasiva [36, 201, 224, 232]; sin embargo, el poder diagnóstico de la combinación de cuatro BMs y el análisis de diferentes cut-offs podría permitir la retirada segura de un tratamiento antifúngico innecesario. La combinación de BMs aun no ha sido estudiada en la candidiasis invasiva.

En este estudio analizamos los cuatro biomarcadores de *Candida* spp para excluir la presencia de candidemia en una cohorte de pacientes no seleccionados con candidemia y bacteriemia. Proponemos, además, el uso de cut-offs alternativos para mejorar la precisión de estas técnicas para las diferentes especies de *Candida* spp.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Pacientes incluidos y muestras estudiadas.

Estudiamos muestras de suero procedentes de adultos con candidemia (n=31) y pacientes con bacteriemia (n=50). Las muestras de suero fueron extraídas de vena periférica dentro de las 48 horas del hemocultivo positivo. Únicamente se empleó una muestra de suero por paciente para estudiar la presencia de CAGTA, MN, AMN, y BDG.

La candidemia fue causada por *C. albicans* (n=12), *C. tropicalis* (n=7), *C. parapsilosis* (n=6), *C. glabrata* (n=4), *C. krusei* (n=1), y *C. albicans* + *C. glabrata* (n=1). La etiología de las bacteriemias usados como control se detallan en la tabla 1 (28 Gram-negativos and 22 Gram-positivos). *Candida* spp fue identificada usando métodos estándar (ID 32C, BioMérieux, Marcy l'Etoile, Francia).

Las muestras de suero fueron conservadas a  $-70^{\circ}\text{C}$  hasta su uso. Ninguna de las muestras sufrió más de un ciclo de congelación/descongelación y tanto los sueros como los reactivos de los kits diagnósticos correspondientes fueron atemperados y homogeneizados convenientemente antes de su uso.

### Detección serológica de los biomarcadores

CAGTA (Vircell Microbiologist S.L., Granada, España) los sueros fueron procesados siguiendo las recomendaciones del fabricante.  $\geq 1/160$  fue el cut-off usado para su positividad.

Para MN y AMN, Platelia *Candida* Ag Plus y Platelia *Candida* Ab Plus fueron automatizados en el EVOLIS<sup>TM</sup> Twin Plus (Bio-Rad, Marnes-la-Coquette, Francia). Los cut-offs del fabricante fueron los siguientes: MN, positivo  $\geq 125$  pg/mL, indeterminado

<125 pg/mL-62.5 pg/mL, negativo MN <62.5 pg/mL; AMN, positivo  $\geq 10$  AU/mL, indeterminado <10 AU/mL-5 U/mL, y negativo <5 U/mL.

BDG fue estudiado usando Fungitell® y las placas fueron colorimétricamente leídas (lector de microplacas ELX808TM y software GEN5, BIOTEK U.S., Vermont, EEUU); Los cut-offs del fabricante para el BDG fueron: positivo  $\geq 80$  pg/mL, indeterminado  $\geq 62$  pg/mL-<80 pg/mL, negativo <62 pg/mL).

### Análisis de datos

Los biomarcadores fueron considerados positivos si  $\geq 1$  de las técnicas (CAGTA, MN, AMN, o BDG) hubieran tenido resultados por encima de los cut-offs recomendados. Las características epidemiológicas y clínicas de los pacientes con candidemia y bacteriemia fueron comparadas. Usamos la prueba exacta de Fisher para evaluar la correlación de CAGTA, MN, AMN, and BDG en los dos grupos de pacientes. Se calcularon sensibilidad (S), especificidad (E) y la precisión (A) de los test. Los valores con distribución normal fueron expresados como la media  $\pm$  desviación típica. Un valor de  $P < 0.05$  fue considerado estadísticamente significativo.

Para mejorar el valor diagnóstico de estas técnicas se trazaron curvas ROC (receiver operating characteristic) y se revisaron todos sus puntos de acuerdo con su sensibilidad y especificidad. Se eligieron como óptimos cut-offs aquellos puntos de la curva que presentasen los mejores pares de sensibilidad y especificidad. Los cut-offs alternativos estudiados fueron CAGTA 1/80 (CAGTA80), MN 125 pg/mL y 75 pg/mL (MN125 and MN75), AMN 10 AU/mL (AMN10), y BDG 80 pg/mL (BDG80). Las curvas ROC fueron construidas para cada biomarcador individualmente y para todas las

posibles combinaciones entre ellos (con un intervalo de confianza del 95%) y fueron comparadas sus áreas bajo la curva (AUC). Se hizo uso de la regresión logística para verificar la optimización de la combinación de varios biomarcadores en el diagnóstico de la candidiasis invasiva.

Calculamos los valores predictivos positivos (VPP) y los valores predictivos negativos (VPN) para la prevalencia de candidemia de nuestro estudio y para prevalencias del 5% y del 10%.

## RESULTADOS

### Características de los pacientes

Las características demográficas de los pacientes se muestran en la tabla 1. Los pacientes con candidemia fueron ingresados con mayor frecuencia en las unidades quirúrgicas (48.4% frente a 20%;  $P<0.05$ ) y tuvieron una estancia hospitalaria más prolongada, previo al primer hemocultivo positivo diagnóstico de infección, que los pacientes con bacteriemia (17 frente a 4 días;  $P<0.05$ ). Los factores de riesgo tradicionales de infección por *Candida* spp (ej., catéter intravenosos, nutrición parenteral total, ventilación mecánica, cirugía abdominal, uso de antibióticos de amplio espectro, y colonización previa por *Candida* spp.) fueron significativamente más comunes en los pacientes con candidemia (**Tabla 1**). El origen de la infección en sangre estuvo relacionada con el catéter con mayor frecuencia en los pacientes con candidemia (38.7% frente a 8%,  $P<0.05$ ). La mortalidad, finalmente, fue también



significativamente mayor en los pacientes con candidemia que en los pacientes con bacteriemia (tabla 1).

Tabla 1. Características de los 31 pacientes con candidemia y 50 pacientes con bacteremia.

	Candidemia (31)	Bacteremia <sup>b</sup> (50)	P
<b>Sexo (hombre)</b>	14 (45.2%)	34 (68%)	0.042
<b>Edad (media ± SD años)</b>	66.4 ± 14.7	65.6 ± 17.3	-
<b>Servicio de ingreso</b>			
Quirúrgico	15 (48.4%)	10 (20%)	0.007
Médico	10 (32.3%)	34 (68%)	0.002
Onco-hematológico	4 (12.9%)	2 (4%)	0.131
UCIs	2 (6.5%)	4 (8%)	0.796
<b>Enfermedad de base</b>			
Gastrointestinal	18 (58.1%)	21 (42%)	0.160
Tumor sólido	16 (51.6%)	15 (30%)	0.052
Hepatopatía	6 (19.4%)	14 (28%)	0.380
E. Genito-urinaria	7 (22.6%)	16 (32%)	0.361
Cardiovascular	6 (19.4%)	13 (26%)	0.493
Insuficiencia renal	6 (19.4%)	10 (20%)	0.943
Diabetes	6 (19.4%)	10 (20%)	0.943
Neoplasia hematológica	2 (6.5%)	2 (4%)	0.621
E. Pulmonar	3 (9.7%)	6 (12%)	0.746
TOS	0 (0%)	5 (10%)	0.069
<b>Días de ingreso previos (median ± SD)</b>	17 ± 59.8	4.1 ± 8.2	-
<b>Factores de riesgo de Candidiasis</b>			
Catéter intravascular	29 (93.5%)	20 (40%)	<0.001
Cirugía	17 (54.8%)	15 (30%)	0.026
Sonda vesical	12 (38.7%)	15 (30%)	0.419
NPT	15 (48.4%)	3 (6%)	<0.001
Ventilación mecánica	7 (22.6%)	3 (6%)	0.027
Cirugía abdominal	12 (38.7%)	7 (14%)	0.011
Inmunosupresión	3 (9.7%)	9 (18%)	0.305
Hemodiálisis	4 (12.9%)	3 (6%)	0.282
Antibiótico de amplio espectro	31 (100%)	11 (22%)	<0.001
Profilaxis antifúngica	5 (16.1%)	5 (10%)	0.415
Colonización/infección por <i>Candida</i> spp.	31 (100%)	11 (22%)	<0.001
<b>Origen de la infección en sangre</b>			
Catéter	12 (38.7%)	4 (8%)	0.001
Primario	3 (9.7%)	3 (6%)	0.539
Urinario	4 (12.9%)	14 (28%)	0.112
Intra-abdominal	10 (32.3%)	16 (32%)	0.981
Respiratorio	1 (3.2%)	6 (12%)	0.172
Endocarditis/endovascular	0 (0%)	2 (4%)	0.260
Infección de piel y tejidos blandos <sup>a</sup>	0 (0%)	5 (10%)	0.069
SNC	1 (3.2%)	0 (0%)	0.201
<b>Mortalidad global</b>	11 (35.5%)	1 (2%)	<0.001
<b>Mortalidad relacionada (0-7 días)</b>	5 (16.1%)	0 (0%)	0.003

<sup>a</sup> Infección de piel y tejidos blandos (n=2), herida quirúrgica (n=1), artritis séptica (n=2).

<sup>b</sup> *Acinetobacter baumannii* (n=2), *Escherichia coli* (n=9), *Escherichia coli* + *Enterococcus faecium* (n=1), *Escherichia coli* + *Enterococcus faecalis* (n=1), *Enterococcus faecium* (n=1), *Enterococcus faecalis* (n=4), *Enterobacter aerogenes* (n=1), *Enterobacter cloacae* (n=1), *Haemophilus influenzae* (n=1), *Klebsiella pneumoniae* (n=2), *Klebsiella pneumoniae* + *Escherichia coli* (n=1), *Moraxella catarrhalis* (n=1), *Proteus mirabilis* (n=1), *Pseudomonas aeruginosa* (n=4), *Salmonella enteritidis* (n=2), *Staphylococcus aureus* (n=7), *Staphylococcus coagulasa-negativo* (n=1), *Serratia marcescens* (n=1), *Staphylococcus epidermidis* (n=3), *Streptococcus bovis* (n=2), *Streptococcus pneumoniae* (n=3), y *Streptococcus viridans* (n=1).

### Resultados de CAGTA, MN / AMN, y BDG individualmente.

La sensibilidad, especificidad, VPP, VPN y la precisión diagnóstica de CAGTA, MN, AMN, y BDG empleados individualmente para el diagnóstico de candidiasis invasiva se muestra en la tabla 2. La sensibilidad de los biomarcadores estuvo comprendida entre 58% (CAGTA) y 83.9% (BDG) y la especificidad entre 65.8% (AMN) y 95.7% (MN).

Fueron detectados falsos positivos y falsos negativos en todos ellos (tabla 2). Así, en los pacientes con candidemia, la sensibilidad fue del 83.9% para el BDG, 58.1% para CAGTA y MN, y 51.6% para AMN. La frecuencia de resultados indeterminados fue del 9.7% para el MN, y 16% para el AMN.

En los pacientes con bacteremia, el ratio de falsos positivos fue del 6% para CAGTA y MN, del 8% para el BDG, y del 26% para el AMN. Las bacterias que generaron resultados falsos positivos fueron las siguientes: CAGTA, *Staphylococcus epidermidis* (n=3); MN, *Acinetobacter baumannii* (n=2) y *Serratia marcescens* (n=1); y BDG, *Staphylococcus aureus* (n=2), *Klebsiella pneumoniae* (n=1), y *Enterococcus faecalis* (n=1) para el BDG. AMN también tuvo un alto porcentaje de resultados indeterminados en los pacientes con bacteriemia (22%). Curiosamente, todos los pacientes que tuvieron bacteriemia por *Pseudomonas aeruginosa* (n = 4) tuvieron resultados falsos positivos en el AMN; ninguno de los pacientes estuvo colonizado por *Candida* spp.

Los cut-offs alternativos no mejoraron el valor diagnóstico de los test empleados solos (tabla 2). Sin embargo, para los casos de MN, AMN, y BDG, los cut-offs alternativos clasificaron los resultados indeterminados como positivos o negativos.

TABLA 2. Resultados de CAGTA, MN, AMN, y BDG solos y combinados en pacientes con candidemia y bacteremia, con cut-offs del fabricante y los alternativos.

BMs solos y combinados	Resultados	Candidemia (n=31)	Bacteremia (n=50)	Sensibilidad (95% CI)	Especificidad (95% CI)	VPP <sup>a</sup> (95% CI)	VPN <sup>a</sup> (95% CI)	Precisión (95% CI)
<b>Cut-offs de los fabricantes</b>								
<b>CAGTA</b>	Positivo	18 (58.1%)	3 (6.0%)	58,1 (39.3-74.9)	92.0 (79.9-97.4)	81.8 (59.0-94.0)	78.0 (64.9-87.3)	79.0 (68.3-87.0)
	Negativo	13 (41.9%)	47 (94.0%)					
<b>MN</b>	Positivo	18 (58.1%)	2 (4.0%)	64.3 (44.1-80.7)	95.7 (84.3-99.3)	90.0 (66.9-98.2)	81.8 (68.6-90.5)	84.0 (73.3-91.1)
	Indeterminado	3 (9.7%)	3 (6.0%)					
	Negativo	10 (32.2%)	45 (90.0%)					
<b>AMN</b>	Positivo	16 (51.6%)	13 (26.0%)	61.5 (40.7-79.1)	65.8 (48.6-79.9)	55.2 (36.0-73.0)	71.4 (53.5-84.8)	64.1 (51.0-75.4)
	Indeterminado	5 (16.1%)	12 (24.0%)					
	Negativo	10 (32.2%)	25 (50.0%)					
<b>BDG</b>	Positivo	26 (83.9%)	4 (8.0%)	83.9 (65.5-93.9)	91.8 (79.5-97.3)	86.7 (68.4-95.6)	90.0 (77.4-96.3)	88.7 (79.2-94.4)
	Indeterminado	0	1 (2.0%)					
	Negativo	5 (16.1%)	45 (90.0%)					
<b>MN/AMN</b>	Positivo	25 (80.6%)	15 (30.0%)	86.2 (67.4-95.5)	60.5 (43.4-75.5)	62.5 (45.8-76.8)	85.2 (65.4-95.1)	71.6 (59.1-81.7)
	Indeterminado	2 (6.5%)	12 (24.0%)					
	Negativo	4 (12.9%)	23 (46.0%)					
<b>CAGTA/BDG</b>	Positivo	29 (93.5%)	6 (12.0%)	93.5 (77.2-98.9)	88.0 (75.0-95.0)	82.9 (65.7-92.8)	95.6 (84.0-99.2)	90.1 (80.9-95.3)
	Indeterminado	0	0					
	Negativo	2 (6.5%)	44 (88.0%)					
<b>BDG/AMN</b>	Positivo	29 (93.5%)	17 (34.0%)	96.7 (80.9-99.8)	59.0 (42.2-74.0)	64.4 (48.7-77.7)	95.8 (76.9-99.8)	75.4 (63.3-84.6)
	Indeterminado	1 (3.2%)	10 (20.0%)					
	Negativo	1 (3.2%)	23 (46.0%)					
<b>CAGTA/MN/AMN/BDG</b>	Positivo	30 (96.8%)	21 (42.0%)	96.7 (81.5-99.8)	48.8 (33.1-64.6)	58.8 (44.2-72.1)	95.2 (74.1-99.7)	69.4 (57.3-79.5)
	Indeterminado	0	9 (18.0%)					
	Negativo	1 (3.2%)	20(40.0%)					

Cut-offs alternativos								
CAGTA80	Positivo	21 (67.7%)	5 (10.0%)	67.7	90.0	80.8	81.8	81.5
	Negativo	10 (32.3%)	45 (90.0%)	(48.5-82.7)	(77.4-96.3)	(60.0-92.7)	(68.6-90.5)	(71.0-88.9)
MN75	Positivo	20 (64.5%)	3 (6.0%)	64.5	94.0	87.0	81.0	82.7
	Negativo	11 (35.5%)	47 (94.0%)	(45.4-80.2)	(82.5-98.4)	(65.3-96.6)	(68.2-89.7)	(72.4-89.9)
MN125	Positivo	18 (58.1%)	2 (4.0%)	58.1	96.0	90.0	78.7	81.5
	Negativo	13 (41.9%)	48 (96.0%)	(39.3-74.9)	(85.1-99.3)	(66.9-98.2)	(66.0-87.7)	(71.0-88.9)
AMN10	Positivo	16 (51.6%)	13 (26.0%)	51.6	74.0	55.2	71.1	65.4
	Negativo	15 (48.4%)	37 (74.0%)	(33.4-69.4)	(59.4-84.9)	(36.0-73.0)	(56.7-82.4)	(54.0-75.4)
BDG80	Positivo	26 (83.9%)	4 (8.0%)	83.9	92.0	86.7	90.2	88.9
	Negativo	5 (16.1%)	46 (92.0%)	(65.5-93.9)	(79.9-97.4)	(68.4-95.6)	(77.8-96.3)	(79.5-94.5)
MN125/ AMN10	Positivo	25 (80.6%)	15 (30.0%)	80.6	70.0	62.5	85.4	74.1
	Negativo	6 (19.4%)	35 (70.0%)	(61.9-91.9)	(55.2-81.7)	(45.8-76.8)	(70.1-93.9)	(62.9-82.9)
CAGTA80/BDG80	Positivo	30 (96.7%)	8 (16.0%)	96.8	84.0	78.9	97.7	88.9
	Negativo	1 (3.3%)	42 (84.0%)	(81.5-99.8)	(70.3-92.4)	(62.2-89.9)	(86.2-99.9)	(79.5-94.5)
CAGTA80/MN75	Positivo	29 (93.5%)	7 (14.0%)	93.5	86.0	80.6	95.6	88.9
	Negativo	2 (6.5%)	43 (86.0%)	(77.2-98.9)	(72.6-93.7)	(63.4-91.2)	(83.6-99.2)	(79.5-94.5)
CAGTA160/BDG80	Positivo	29 (93.5%)	6 (12.0%)	93.5	88.0	82.9	95.6	90.1
	Negativo	2 (6.5%)	44 (88.0%)	(77.2-98.9)	(75.0-95.0)	(65.7-92.8)	(84.0-99.2)	(80.9-95.3)
BDG80/MN125/AMN10	Positivo	29 (93.5%)	19 (38.0%)	93.5	62.0	60.4	93.9	74.1
	Negativo	2 (6.5%)	31 (62.0%)	(77.2-98.9)	(47.2-75.0)	(45.3-73.9)	(78.4-98.9)	(62.9-82.9)
CAGTA160/BDG80/AMN10	Positivo	30 (96.7%)	18 (36.0%)	96.8	64.0	62.5	97.0	76.5
	Negativo	1 (3.3%)	32 (64.0%)	(81.5-99.8)	(49.1-76.7)	(47.3-75.7)	(82.5-99.8)	(65.6-84.9)

**CAGTA**, *Candida albicans* Germ Tube Antibody; **MN**, antígeno manano; **AMN**, anticuerpo anti-manano; **BDG**, (1→3)-beta-D-glucano; **VPP**, valor predictivo positivo; **VPN**, valor predictivo negativo.

<sup>a</sup> Valores predictivos para la prevalencia de este estudio (23.6%). **Cut-offs de los fabricantes**: CAGTA, positivo  $\geq 1/160$  y negativo  $< 1/160$ . MN, positivo  $\geq 125$  pg/mL, indeterminado  $< 125$  pg/mL-62.5 pg/mL, negativo  $< 62.5$  pg/mL. AMN, positivo  $\geq 10$  AU/mL, indeterminado  $< 10$  AU/mL-5 U/mL, y negativo  $< 5$  AU/mL. BDG, positivo  $\geq 80$  pg/mL, indeterminado  $\geq 62$ - $< 80$  pg/mL, negativo  $< 62$  pg/mL. Los resultados indeterminados no fueron considerados para el análisis estadístico. **Cut-offs alternativos**: CAGTA80, positivo  $\geq 1/80$  y negativo  $< 1/80$ . MN75, positivo  $\geq 75$  pg/mL y negativo  $< 75$  pg/mL. MN125, positivo  $\geq 125$  pg/mL y negativo  $< 125$  pg/mL. AMN10, positivo  $\geq 10$  AU/mL y negativo  $< 10$  AU/mL. BDG, positivo  $\geq 80$  pg/mL y negativo  $< 80$  pg/mL.

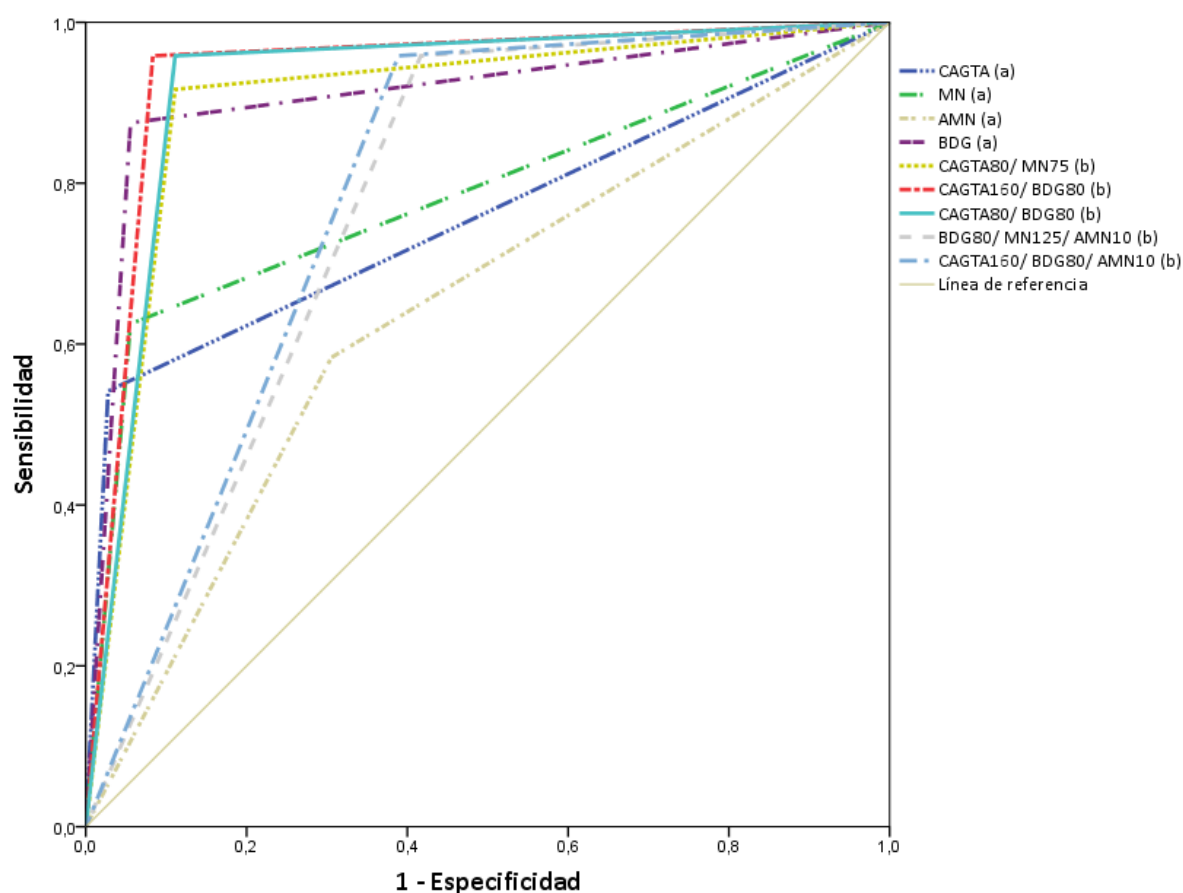
**Combinación de BMS**: positivo si al menos uno de ellos fuera positivo.

### Resultados de CAGTA, MN, AMN, y BDG usados en combinación

Se analizaron todas las posibles combinaciones de los biomarcadores utilizando los cut-offs alternativos (Tabla 2, Figura 1). El análisis de regresión logística reveló que no todos los biomarcadores deben ser combinados para el diagnóstico de candidiasis invasiva. Cuando se usaban 3 biomarcadores juntos, las mejores combinaciones fueron las siguientes CAGTA160/BDG80/AMN10 (sensibilidad 96.8% y especificidad 64.0%) y BDG80/MN125/AMN10 (sensibilidad 93.5% y especificidad 62.0%). Sin embargo, las mejores opciones fueron CAGTA80/BDG80 (sensibilidad 96.8% y especificidad 84.0%), CAGTA160/BDG80 (sensibilidad 93.5% y especificidad 88.0%) y CAGTA80/MN75 (sensibilidad 93.5% y especificidad 86.0%). El mayor VPN lo encontramos en la combinación CAGTA80/BDG80, que fue la mejor para la exclusión de candidemia, aunque no se encontraron diferencias significativas cuando se comparó con BDG80 usado de forma individual.

Como se muestra en la figura 1, las combinaciones CAGTA80/BDG80 y CAGTA80/MN75 dieron lugar a unas AUCs en las curvas ROC de 0.924 y 0.903, respectivamente. Sin embargo, CAGTA160/BDG80 presentó una AUC ligeramente superior (0.938), pero su sensibilidad fue menor que CAGTA80/BDG80 (93.5% frente a 96.8%).

Figura 1. Curva ROC (Receiver Operating Characteristic) mostrando posibles combinaciones de biomarcadores con diferentes cut-offs estudiados. Las mejores sensibilidades y especificidades para el diagnóstico de candidemia fueron observadas en las combinaciones CAGTA80/BDG80, CAGTA80/MN75, CAGTA160/BDG80, BDG80/MN125/AMN10, y CAGTA160/BDG80/AMN10.



CAGTA: *Candida albicans* Germ Tube Antibody; MN: antígeno manano; AMN: anticuerpos anti-manano; BDG: (1→3)-beta-D-Glucano.

(a): Cut-offs de los fabricantes. (b): Cut-offs alternativos. Las AUCs de los biomarcadores usados de forma independiente y combinados (95% de IC) fueron las siguientes: CAGTA, 0.757 (0.621-0.893); MN, 0.785 (0.655-0.915); AMN, 0.639 (0.494-0.784); BDG, 0.910 (0.821-0.999); CAGTA80/MN75, 0.903 (0.815-0.991); CAGTA160/BDG80, 0.938 (0.867-1.000); CAGTA80/BDG80, 0.924 (0.847-1.000); BDG80/MN125/AMN10, 0.771 (0.652-0.890); y CAGTA160/BDG80/AMN10, 0.785 (0.668-0.901).

### Efecto de *Candida* spp causantes de candidemia sobre el resultado de los biomarcadores.

La tabla 3 muestra la sensibilidad de los diferentes biomarcadores, solos y en combinación, según las especies de *Candida* spp causantes de las fungemias. Las combinaciones CAGTA80/BDG80 y CAGTA80/MN75 mostraron una sensibilidad del 100% para *C. albicans*, *C. tropicalis*, y *C. parapsilosis*. La candidemia causada por *C. krusei* únicamente fue detectada cuando BDG fue incluido en la combinación de biomarcadores.

El VPP y el VPN de los biomarcadores, usados de forma individual y combinados, fueron calculados **para diferentes valores de prevalencia** (tabla 4). Para la prevalencia de candidemia de este estudio (23.6%), los VPP y VPN fueron 78.9% y 97.7% para CAGTA80/BDG80 y 80.6% y 95.6% para CAGTA80/MN75. Para prevalencias menores de candidemia (5% y 10%), los VPN fueron los siguientes: CAGTA80/BDG80, 99.8% y 99.6%, respectivamente; y CAGTA80/MN75, 99.6% y 99.2%, respectivamente.



Tabla 3. Sensibilidad de los biomarcadores de acuerdo con las especies de *Candida* causantes de la candidemia. La combinación fue considerada positiva si al menos uno de los biomarcadores fue positivo.

<i>Candida</i> spp. (31)	CAGTA <sup>a</sup>	MN <sup>a</sup>	AMN <sup>a</sup>	BDG <sup>a</sup>	CAGTA80/BDG80 <sup>b</sup>	CAGTA80/MN 75 <sup>b</sup>	CAGTA160/BDG80 <sup>b</sup>	BDG80/ MN125/ AMN10 <sup>b</sup>	CAGTA160/B DG80/AMN10 <sup>b</sup>
<i>C. albicans</i> (12)	10 (83.3%)	8 (66.7%)	7 (58.3%)	8 (66.7%)	12 (100.0%)	12 (100.0%)	12 (100.0%)	11 (91.7%)	12 (100.0%)
<i>C. tropicalis</i> (7)	2 (28.6%)	6 (85.7%)	2 (28.6%)	7 (100.0%)	7 (100.0%)	7 (100.0%)	7 (100.0%)	7 (100.0%)	7 (100.0%)
<i>C. parapsilosis</i> (6)	3 (50.0%)	2 (33.3%)	4 (66.7%)	5 (83.3%)	6 (100.0%)	6 (100.0%)	5 (83.3%)	6 (100.0%)	5 (83.3%)
<i>C. glabrata</i> (4)	3 (75.0%)	1 (25.0%)	3 (75.0%)	3 (75.0%)	3 (75.0%)	3 (75.0%)	3 (75.0%)	3 (75.0%)	3 (75.0%)
<i>C. krusei</i> (1)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	1 (100.0%)	1 (100.0%)	0 (0.0%)	1 (100.0%)	1 (100.0%)	1 (100.0%)
<i>C. albicans</i> + <i>C. glabrata</i> (1)	0 (0.0%)	1 (100.0%)	0 (0.0%)	1 (100.0%)	1 (100.0%)	1 (100.0%)	1 (100.0%)	1 (100.0%)	1 (100.0%)

CAGTA, *Candida albicans* Germ Tube Antibody; MN, antígeno manano; AMN, anticuerpos anti-manano; BDG, (1→3)-beta-D-Glucano.

Los resultados indeterminados fueron considerados como no detectados (MN, 1 *Candida tropicalis*, 1 *Candida parapsilosis*, y 1 *Candida glabrata* 1 de cada each; AMN, 3 *Candida albicans* y 2 *Candida tropicalis*; BDG, 1 *Candida glabrata*).

<sup>a</sup> Cut-offs de los fabricantes. <sup>b</sup> Cut-offs alternativos.

Tabla 4. VPP y VPN (%) para diferentes valores de prevalencia

Prevalencias	23.6% <sup>c</sup>		10%		5%	
Biomarcadores	VPP	VPN	VPP	VPN	VPP	VPN
CAGTA <sup>a</sup>	81.8	78.0	44.6	95.2	27.6	97.6
MN <sup>a</sup>	90.0	81.8	62.4	96.0	44.0	98.1
AMN <sup>a</sup>	55.2	71.4	16.6	93.9	8.6	97.0
BDG <sup>a</sup>	86.7	90.0	53.2	98.1	35.0	99.1
CAGTA160 <sup>b</sup>	81.8	78.0	44.6	95.2	27.6	97.6
CAGTA80 <sup>b</sup>	80.8	81.8	42.9	96.2	26.3	98.1
BDG80 <sup>b</sup>	86.7	90.2	53.8	98.1	35.6	99.1
MN125 <sup>b</sup>	90.0	78.7	61.7	95.4	43.3	97.7
MN75 <sup>b</sup>	87.0	81.0	54.4	96.0	36.2	98.0
AMN10 <sup>b</sup>	55.2	71.1	18.1	93.2	9.4	96.7
MN125/AMN10 <sup>b</sup>	62.5 <sup>d</sup>	85.4	23.0	97.0	12.4	98.6
BDG80/MN125/AMN10 <sup>b</sup>	60.4 <sup>d</sup>	93.9 <sup>e</sup>	21.5	98.8	11.5	99.4
CAGTA80/MN75 <sup>b</sup>	80.6	95.6 <sup>e</sup>	42.6	99.2	26.0	99.6
CAGTA160/BDG80 <sup>b</sup>	82.9	95.6 <sup>e</sup>	46.4	99.2	29.1	99.6
CAGT80/BDG80 <sup>b</sup>	78.9	97.7 <sup>e</sup>	40.2	99.6	19.4	99.8

<sup>a</sup> Cut-offs de los fabricantes. Los resultados indeterminados fueron eliminados del análisis estadístico.

<sup>b</sup> Cut-offs alternativos. CAGTA, *Candida albicans* Germ Tube Antibody; MN, antígeno manano; AMN, anticuerpos anti-manano; BDG, (1→3)-beta-D-glucano. <sup>c</sup> Prevalencia de esta cohorte. <sup>d</sup> Valor-*P* resultantes de comparar VPPs de los biomarcadores usados individualmente y en combinación: BDG80 frente a BDG80/MN125/AMN10, MN125 frente a BDG80/MN125/AMN10 y frente a MN125/AMN10,  $p < 0.05$ . <sup>e</sup> Valor-*P* resultantes de comparar VPNs de los biomarcadores usados individualmente y en combinación: CAGTA160 frente a CAGTA160/BDG80, CAGTA80 frente a CAGTA80/BDG80, MN75 frente a CAGTA80/MN75 y AMN10 frente a BDG80/MN125/AMN10,  $p < 0.05$ .

## DISCUSIÓN

Nuestros resultados muestran que la combinación de CAGTA/ BDG o CAGTA/ MN tienen muy alto VPN (>99%), permitiendo excluir candidemia en pacientes de muy alto riesgo y dirigir los programas de antifungal stewardship hacia la retirada temprana de tratamientos antifúngicos empíricos innecesarios. Los cut-offs alternativos para CAGTA/ BDG y para CAGTA/ MN incrementaron significativamente la sensibilidad y especificidad de los tests y ayudaron en la interpretación de los resultados indeterminados.

La sospecha de CI está basada en "scores" clínicos que muestran una alta sensibilidad pero baja especificidad [97]. El hecho de que muchos pacientes con CI no desarrollen candidemia produce un sobreuso de tratamiento antifúngico lo cual podría disminuirse con la ayuda de herramientas de alta sensibilidad y especificidad. Por tanto, buscamos la mejor combinación de biomarcadores (a diferentes cut-offs) que pudieran incrementar el VPN y VPP en la candidemia tanto como fuera posible.

BDG, CAGTA, y MN aportan resultados en aproximadamente de 4 horas y son más coste-efectivos que los tratamientos antifúngicos empíricos. Sin embargo, las guías clínicas recomiendan su uso para el diagnóstico de candidemia pero no para retirar un tratamientos [193, 227, 271, 272].

CAGTA detecta anticuerpos anti-micelio dirigidos contra el antígeno hpw1, el cual solo se expresa durante el estado invasivo de la infección por *Candida spp* [36, 260]. Detectamos tres falsos positivos en pacientes con bacteriemia por *S. epidermidis*;

y un falso negativo se correspondió con un paciente que desarrolló candidemia relacionada con el catéter (datos no mostrados). CAGTA puede ser empleado para determinar el origen de la candidemia, si está en el catéter o en órganos profundos, como ya se ha publicado previamente [225]. Las limitaciones de este test, cuando se emplea de manera individual, ha sido discutido en otros estudios [273].

La sensibilidad y especificidad del BDG es de moderada a alta (56%-93% y 71%-100%, respectivamente) para el diagnóstico de candidemia y se ha mostrado superior al *Candida* "score" y al índice de colonización [201, 202]. Su principal limitación es la presencia de falsos positivos [207, 208], la pérdida de especificidad, y el coste de la técnica [219]. En nuestra serie, 5/31 (16%) de los pacientes con candidemia tuvieron el BDG negativo (NPV 90.0%), aunque el ratio de falsos positivos en pacientes con bacteriemia fue bajo (4 pacientes, 8%). Dos de los pacientes eran portadores de terapia renal de sustitución, el tercero de ellos recibió transfusión de productos sanguíneos, y el cuarto falso positivo fue tratado con Ceftriaxona. Todas esas condiciones generan falsos positivos en el BDG lo cual debe ser tenido en consideración [208, 209]. Otra posibilidad para uno de los pacientes es que hubiera tenido una candidiasis invasiva oculta. De hecho, también presentó el resultado de CAGTA positivo (1/160).

MN y AMN se usan tradicionalmente en combinación para la detección del antígeno manano de la pared celular de *Candida* spp (la cual es excretada a sangre) y los anticuerpos anti-mananos dirigidos contra aquellos [230, 232, 274]. En nuestra experiencia, los AMN no aportan un beneficio significativo en el diagnóstico de la

candidemia. De hecho, cuando AMN es añadido a las combinaciones CAGTA/MN o CAGTA/BDG, las sensibilidades permanecen sin cambios, pero la especificidad disminuye debido al alto ratio de falsos positivos en pacientes con bacteriemia como se ha comprobado en otros estudios [232]. En nuestra serie, el VPN de MN/AMN estuvo entorno al 85%. Sin embargo, la técnica tuvo sus desventajas, tales como el alto porcentaje de resultados indeterminados (16.1% en candidemia y 24% en bacteremia) y resultados falsos negativos en pacientes con candidemia (41.9% MN y 48.3% AMN). La sensibilidad para *C. albicans* y *C. tropicalis* fue del 70% y el 100%, respectivamente, pero solo el 35% para el resto de las especies ( $P = 0.046$ ). La cantidad de MN detectable varia de unas especies a otras de *Candida* spp, debido a que los anticuerpos mAbEBCA-1 usados en esta técnica detecta beta-(1-5)-oligosacáridos que no están presentes en todas las especies de *Candida*. Los resultados son especialmente pobres para *C. krusei* y *C. parapsilosis*. Estos resultados se han informado previamente [230-234]. Finalmente, observamos falta de reproducibilidad (significante reducción en las concentraciones de MN, incluso muy por debajo del cut-off recomendado por el fabricante, para muestras previamente positivas). Este hallazgo es crítico y debería ser evaluado más concienzudamente. Sin embargo, para el propósito de este estudio, hemos seguido la metodología de artículos previos y hemos considerado la primera determinación de MN como válido.

Es necesario mencionar que cuando analizamos los resultados de los biomarcadores en 50 controles sanos (datos no mostrados), AMN fue el único test que presentó falsos positivos (8%).

Ninguno de los biomarcadores usado solo tuvo suficiente sensibilidad para la detección de una infección invasiva por *Candida* spp (sensibilidad <84%). En contraste, el uso simultáneo de varios biomarcadores mejoró la sensibilidad sin apenas decrecimiento de la especificidad. El VPN del BDG80 usado solo fue, sin embargo, comparable a las combinaciones en las que se incluye BDG80, principalmente en aquellas poblaciones en las que hay una baja prevalencia de candidemia (5-10%). Para poblaciones de mayor prevalencia de candidemia, un incremento en el VPN de 7%-10% es producido si CAGTA80 es incorporado al BDG, aunque estas diferencias no fueron estadísticamente significativas con respecto al uso individual del BDG aunque sí con respecto al CAGTA80 usado de forma individual.

Otros autores ya han sugerido que el uso de varios biomarcadores de manera conjunta podría mejorar el papel diagnóstico de los biomarcadores usados solos [233]. Algunos estudios han demostrado que los hemocultivos y la PCR de *Candida*, con o sin el BDG, mejoran la detección de la candidiasis invasiva [232, 237]. Sin embargo, la PCR es cara, lenta y no está estandarizada; y, los falsos positivos en el BDG podrían promover el uso innecesario de antifúngicos [210, 214].

El alto VPN de la combinación de biomarcadores para la exclusión de la CI (CAGTA80/BDG80 97.7%) podría emplearse de forma segura en la retirada de tratamientos antifúngicos empíricos. Además, ello podría ser coste-efectivo considerando el coste de los test (por determinación: CAGTA: 10 €, MN y AMN: 5 € cada uno de ellos, y BDG: 30 €) en comparación con el alto precio de los antifúngicos.

## CONCLUSIONES

La combinación de los biomarcadores, usando los cut-offs alternativos a los recomendados por los laboratorios, de CAGTA80/BDG80 o de CAGTA80/MN75, puede excluir candidemia con un VPN >99%.

La combinación de los biomarcadores para el diagnóstico de CI podría ser una herramienta complementaria en los programas de antifungal stewardship.

Esta estrategia, no obstante, debería ser validada en ensayos prospectivos con poblaciones de mayores tamaños y homogéneos antes de su implementación en la práctica clínica.

## LIMITACIONES

Nuestro estudio tiene una serie de limitaciones. Primero, es un estudio retrospectivo realizado en un solo centro sobre una población heterogénea y el número de candidemias analizadas es baja. Sin embargo, para nuestro conocimiento, es la primera vez que se analiza el papel potencial de la combinación de biomarcadores (CAGTA, MN, AMN, y BDG) para la exclusión de candidemia. En segundo lugar, hemos estudiado pacientes con candidemia como marcador sustituto de la candidiasis invasiva, pero la estrategia aun no se ha estudiado en pacientes con otras formas de candidiasis invasiva.

## **OBJETIVO 3**

**Análisis del papel potencial de la determinación seriada de CAGTA y BDG en pacientes con tratamiento antifúngico empírico por sospecha de candidiasis invasiva para la retirada precoz del tratamiento antifúngico innecesario**



## INTRODUCCIÓN

El sobreuso de antifúngicos está justificado principalmente por la elevada morbilidad y mortalidad asociada a la candidemia (C) y a la candidiasis invasiva (CI), sumado al retraso y pérdida de sensibilidad de las técnicas microbiológicas convencionales [67, 269]. Al quinto día de iniciado el tratamiento antifúngico en pacientes con sospecha de CI, los hemocultivos son negativos en la mayor parte de los casos [131, 146]. Los clínicos, sin embargo, aun encuentran muchos problemas a la hora de decidir cuándo retirar un tratamiento antifúngico de manera segura en aquellos pacientes con sospecha de CI incluso en pacientes con hemocultivos negativos donde nunca se prueba CI, ya que es difícil asociar el potencial papel del antifúngico empírico a la evolución del paciente.

Los biomarcadores serológicos (BM) de CI tales como los anticuerpos antimicelio (CAGTA), (1→3)-β-D-Glucan (BDG), antígeno manano (MN) y anticuerpos anti-manano (AMN) han sido principalmente usados para el diagnóstico precoz de la CI pero no para su exclusión [201, 207, 275]. Además, hay muy poca información de estos BMs en pacientes con CI profunda y hemocultivos negativos [201].

Las limitaciones de los BMs usados individualmente incluyen los falsos positivos y negativos que presentan y la dificultad de interpretar los resultados indeterminados [265]. El valor que presentan la combinación de estos BMs más allá del quinto día de iniciado un tratamiento antifúngico aun no se ha evaluado.

Nuestro objetivo en el presente estudio ha sido evaluar el valor diagnóstico de la combinación de CAGTA y BDG [257], en la exclusión de candidiasis en aquellos pacientes que reciben tratamiento antifúngico empírico por sospecha de CI.

## MATERIALES Y MÉTODOS

Estudio observacional prospectivo llevado a cabo entre junio del 2012 y enero del 2014 en el Hospital General Universitario Gregorio Marañón, Madrid (España).

**Los criterios de inclusión fueron:** pacientes adultos (mayores de 18 años), no embarazadas, no hematológicos, que reciban cualquier tratamiento antifúngico empírico por sospecha de CI de acuerdo con las guías clínicas locales e internacionales [89, 114, 193, 194] y que consientan su participación mediante la firma de un consentimiento informado; y, los **criterios de exclusión**, aquellos pacientes que en el momento de la inclusión en el estudio tengan CI probada, tratamiento antifúngico empírico de más de 5 días o que estén recibiendo el tratamiento por otras micosis invasivas diferentes de la candidiasis.

Las muestras de suero fueron extraídas por punción venosa en los días 0, +3 y +5 después de iniciado el tratamiento antifúngico empírico para la determinación de CAGTA y BDG.

Los resultados de los BMs no fueron informados a los clínicos a cargo de los correspondientes pacientes. Tanto las técnicas diagnósticas rutinarias de microbiología (hemocultivos, cultivos de catéter así como de otras muestras clínicas) y de radiología

fueron llevadas a cabo según la práctica clínica convencional y las guías locales. Al final del estudio, cada historia clínica fue revisada independientemente por tres investigadores ciegos a los resultados de los biomarcadores. Si la clasificación de los casos era discordante o dudoso, fueron reconsiderados y clasificados en sesión clínica (fue requerido acuerdo unánime).

Los resultados fueron analizados en el conjunto de toda la población incluida y tras estratificar a los pacientes según su ingreso o no en una unidad de cuidados intensivos (UCIs médicas y quirúrgicas frente a pacientes ingresados en otros servicios).

Los datos clínicos y microbiológicos fueron prospectivamente recogidos de acuerdo a un protocolo pre-establecido que incluyeron: datos demográficos de los pacientes, factores de riesgo de CI, severidad de la enfermedad en el momento de la inclusión del estudio, resultados de test microbiológicos y radiológicos, mortalidad total durante el ingreso y días de estancia hospitalaria. Como variables microbiológicas se recogieron el tipo de CI, el origen de la infección y las especies aisladas.

Las posibles razones de falsos positivos en el BDG (albumina [218, 255, 276], inmunoglobulina intravenosa [255, 276-278], antibióticos betalactámicos [279], transfusiones de productos sanguíneos [214, 255, 276, 278, 280, 281], HFVVC [255, 276], cirugía abdominal [255, 276], bacteriemia [255, 276, 282] y bilirrubina > 10 x 1.1 [276] fueron también recogidos. Fueron excluidos del análisis aquellos pacientes con menos de tres muestras de suero.

Para explorar el papel de los biomarcadores en los servicios de ingreso con diferentes probabilidades pre-test de desarrollar CI, además clasificamos nuestros pacientes según sus principales patrones fisiopatológicos dentro de cuatro grupos como han sugerido previamente Eggimann y León [53, 97]: pacientes inmunodeprimidos (pacientes onco-hematológicos y receptores de trasplante de órgano sólido), pacientes con cirugía digestiva de alto riesgo (incluyendo peritonitis terciaria, pérdida de anastomosis, perforación digestiva recurrente y pancreatitis necrotizante), otras cirugías abdominales y otros pacientes (cirugía no abdominal y pacientes médicos).

## Definiciones

### **Candidiasis invasiva probada**

Fue definida como hemocultivos positivos para *Candida* spp o positividad en los exámenes histopatológicos, citopatológicos o microscópicos de muestras clínicas normalmente estériles obtenidas mediante biopsias o por aspiración con aguja y/o la recuperación de *Candida* spp por cultivo microbiológico de muestras obtenidas por procedimientos estériles de lugares normalmente estériles mostrando además clínica de anormalidades radiológicas consistentes en un proceso de enfermedad infecciosa [194].

**Candidiasis intra-abdominal** fue definida como el aislamiento de *Candida* spp. De una muestra intra-abdominal profunda obtenida por procedimiento estéril (incluyendo cirugía, punciones y drenajes colocados antes de las 24hs) en pacientes con anormalidades clínicas o radiológicas consistente en un proceso [107].

**Candidiasis invasiva probable** se definió como fiebre ( $\geq 38.5^{\circ}\text{C}$ ) o hipotermia ( $< 35^{\circ}\text{C}$ ) con leucocitosis ( $\text{WBC} \geq 12\text{K}$ ) y/o inestabilidad hemodinámica ( $\text{MAP} < 65 \text{ mmHg}$ ) sin otra causa posible a pesar de al menos 3 días de antibiótico de amplio espectro y las dos condiciones siguientes: a) aislamiento de *Candida* spp. de al menos 2 lugares no-estériles [ $\pm 3$  days]) y b) ningún diagnóstico microbiológico alternativo. Infección del trato urinario por *Candida* spp. Sin otro diagnóstico microbiológico, y esofagitis visualizada endoscópicamente con exclusión, mediante biopsia histológica and microbiológica, de otras causas que *Candida* en microscopía y cultivo [255].

La presencia de candidiasis invasiva fue excluida cuando no se cumplieron los criterios de candidiasis invasiva probada y probable, y cuando se estableció otro diagnóstico que explicase la clínica del paciente.

Los pacientes con CI además fueron clasificados in candidemia sin infección profunda por *Candida* (principalmente candidemia relacionada con el catéter), CI sin candidemia (principalmente infección intra-abdominal) y CI con candidemia [57]. Candidemia con infección profunda fue definida como la presencia de al menos un hemocultivo positivo con otra muestra positiva de lugar normalmente estéril relacionado con un foco específico de infección.

## Métodos microbiológicos

### Método de identificación de *Candida* spp.

La identificación de *Candida* spp se llevó a cabo por los métodos microbiológicos convencionales, mediante ID 32C (BioMérieux, Marcy l'Etoile. Francia).

**Determinación serológica de *Candida albicans* Germ Tube Antibody (CAGTA).**

Las muestras de suero fueron procesadas según las recomendaciones del fabricante (Vircell Microbiologist S.L., Granada, España). Se consideró CAGTA positivo cuando su resultado fue de un título  $\geq 1/160$  (cut-off recomendado por el fabricante).

**Determinación serológica de (1-3)-beta-D-glucan (BDG).**

La técnica de Fungitell® was realizada de acuerdo con las instrucciones del fabricante y las concentraciones del BDG fueron leídas y analizadas en el lector de micro-placas BIOTEK ELX808TM y el software GEN5 (BIOTEK U.S., Vermont, USA). Los cut-offs propuestos por el fabricante fueron los: positivo  $\geq 80$  pg / mL, indeterminado  $\geq 60$  pg/mL to  $<79$  pg/mL, negativo  $<60$  pg / mL. Consideramos BDG positivo si el resultado fuera  $\geq 80$  pg / mL y negativo si BGD fuera  $< 80$  pg / mL para que los resultados indeterminados fueran clasificados como negativos [257].

**Análisis de datos**

La sensibilidad (S), la especificidad (E), el valor predictivo positivo (VPP) y el valor predictivo negativo (VPN) fueron calculados para los días 0, +3 y +5 para cada biomarcador usado de forma independiente y en combinación.

Se usaron dos modelos para asegurar el muestreo óptimo. En el modelo 1 (no-restrictivo), los biomarcadores fueron considerados positivos si alguna de las seis determinaciones (CAGTA y BDG onen los días 0, +3, y +5) fuera positiva. En el modelo 2 (parcialmente restrictivo) al menos dos resultados positivos en CAGTA y/o BDG se requirieron [97, 201, 255]. Ambos modelos fueron usados para cada biomarcador independientemente y en combinación de CAGTA y BDG.

Los biomarcadores fueron analizados en pacientes con CI probada, probada más probable y sin CI. Cuando analizamos los biomarcadores sólo según el “modelo de CI probada”, los casos probables fueron incluidos dentro del grupo clasificado sin CI.

Usamos el test exacto de Fisher de 2-colas para estudiar la correlación de la positividad de CAGTA y/o BDG en la población total y por grupos de pacientes.

Los valores de distribución normal fueron expresados como las media  $\pm$  desviación estándar (SD), y los valores de distribución no-normal como la mediana más el rango intercuartil [IQR]. La curva Receiver operating characteristic (ROC) fue trazada para comparar los modelos 1, modelo 2 y la combinación de CAGTA y BDG en cada punto de tiempo (días 0, +3 y +5 de inicio del tratamiento antifúngico empírico). Un valor  $P < 0.05$  fue considerado estadísticamente significativo.

Los datos fueron introducidos en Access 2007, y el paquete SPSS 20.0 (IBM, SPPS statistic. Armonk, New York. EEUU) fue utilizado para el análisis estadístico.

### Consideraciones éticas

El estudio fue aprobado por el Comité Ético local (CEIC-A1, ref. 247/13) posteriormente a su clasificación por la Agencia Española del Medicamento y Productos Sanitarios (AEMPS).

## RESULTADOS

### Población incluida

Un total de 260 pacientes recibieron tratamiento antifúngico empírico durante el periodo de estudio. De estos, 160 no se incluyeron en el análisis final por las siguientes razones: 27 (10.4%) no firmaron el consentimiento informado, 56 (21.5%) tuvieron <3 sueros (debido a muerte, esperanza de vida <48 horas, y traslado a otro hospital o alta hospitalaria), 47 (18.1%) tuvieron CI probada en el momento de la inclusión en el estudio y 30 (11.5%) tuvieron otra infección fúngica invasora (IFIs) diferente de candidiasis.

Las principales características demográficas y clínicas de los 100 pacientes incluidos se muestran en la tabla 1. La mayoría de los pacientes fueron hombres (67%), y la edad media fue de  $60.8 \pm 15.7$  años. Del total, 63 pacientes estuvieron ingresados en la UCI (44% quirúrgicas y 19% médicas) y 37 en otros servicios (13% quirúrgicos y 24% médicos). Las principales indicaciones para la prescripción de antifúngico empírico fueron cirugía abdominal de alto riesgo y sepsis en pacientes no-quirúrgicos (30% cada uno). Las principales enfermedades de base y las razones de potenciales falsos positivos en los biomarcadores se muestran en la tabla 1.

Los 100 pacientes se clasificaron finalmente como sin CI (58), CI probada (30), y CI probable (12). *C. albicans* fue aislada en el 60% de las CI probadas, principalmente en la UCI (88.9% de los casos). El diagnóstico de CI probada fue más frecuente en los pacientes ingresados en servicios no-UCI (56.7%) que en los pacientes de UCI (14.3%),



$P < 0.001$ . La CI sin candidemia (26/30), principalmente debido a infecciones intra-abdominales (66.7%), fue el principal tipo de CI encontrado en nuestro estudio (tabla 1). Las equinocandinas supusieron el 73% de los tratamientos empíricos (84.1% en la UCI y 54.0% en otros servicios), y la mediana (IQR) de duración del tratamiento empírico fue de 10.0 (6.0-14.0) días. La duración del tratamiento antifúngico en pacientes sin CI fue de 8.5 (4.0-12.0) días. La mortalidad total fue del 31% (42.9% en los pacientes de UCI frente al 10.8% en otros servicios).

Finalmente, la tabla 1 muestra la eficacia de la combinación de los biomarcadores en los pacientes ingresados en la UCI y en no-UCI siguiendo los modelos 1 y 2. La combinación de CAGTA y BDG rindieron una sensibilidad del 100% en los pacientes de UCI y el 95.2% en pacientes de no-UCI con el modelo 1. La sensibilidad en el modelo 2, sin embargo, fue del 88.9% en la UCI y el 80.9% en pacientes de otros servicios.

**Table 1.** Características demográficas de los pacientes con antifúngico empírico.

	<b>Total (n= 100)</b>	<b>UCI (n=63)</b>	<b>No-UCI (n= 37)</b>	<b>P</b>
Sexo (hombre)	67 (67.0%)	41 (65.1%)	26 (70.3%)	0.594
Edad en años (media $\pm$ SD)	60.8 $\pm$ 15.7	60.8 $\pm$ 15.0	60.8 $\pm$ 17.1	0.881
Estancia hospitalaria (días) (mediana [IQR])	56.5 [29.2-91.7]	61.0 [30.0-91.0]	50 [21.5-101.5]	0.620
<b>Días de estancia hospitalaria hasta EAT<sup>a</sup> (median [IQR])</b>				
CI probada IC <sup>b</sup>	21.5 [12.7-35.2]	32.0 [11.0-66.0]	21.0 [10.5-30.0]	0.263
CI probable	13.0 [6.2-28.0]	13.0 [6.0-22.0]	30.0 <sup>e</sup>	0.500
No-CI	9.5 [4.7-20.0]	11.0 [5.0-20.0]	9.0 [4.0-27.0]	0.790
<b>Enfermedad de base al ingreso</b>				
Tumor sólido	22 (22.0%)	16 (25.4%)	6 (16.2%)	0.285
Perforación intestinal	20 (20.0%)	15 (23.8%)	5 (13.5%)	0.214
Enfermedad cardiovascular severa	19 (19.0%)	12 (19.0%)	7 (18.9%)	0.987
Pancreatitis aguda	11 (11.0%)	3 (4.8%)	8 (21.6%)	0.009
Cirrosis	7 (7.0%)	4 (6.3%)	3 (8.1%)	0.739
TOS (previo)	7 (7.0%)	3 (4.8%)	4 (10.8%)	0.252
Infección por VIH	2 (2.0%)	1 (1.6%)	1 (2.7%)	0.700
Enfermedad genitourinaria	2 (2.0%)	-	2 (5.4%)	0.062
Enfermedad autoinmune	2 (2.0%)	2 (3.2%)	-	0.274
Otras	8 (8.0%)	7 (11.1%)	1 (2.7%)	0.135
<b>Estratificación de los pacientes con CI</b>				
Cirugía digestiva de alto riesgo <sup>c</sup>	30 (30.0%)	22 (34.9%)	8 (21.6%)	0.161
Otra cirugía abdominal	18 (18.0%)	10 (15.9%)	8 (21.6%)	0.470
Cirugía no-abdominal	13 (13.0%)	9 (14.3%)	4 (10.8%)	0.618
No cirugías	30 (30.0%)	18 (28.6%)	12 (32.4%)	0.684
Pacientes inmunodeprimidos <sup>d</sup>	9 (9.0%)	4 (6.3%)	5 (13.5%)	0.227
<b>Clasificación del episodio</b>				
CI probada:	30 (30.0%)	9 (14.3%)	21 (56.7%)	<0.001
CI sin candidemia <sup>e</sup>	26 (26.0%)	8 (12.7%)	18 (48.6%)	<0.001
Candidemia sin CI profunda <sup>f</sup>	3 (3.0%)	1 (1.6%)	2 (5.4%)	0.280
CI sin candidemia <sup>g</sup>	1 (1.0%)	0 (0.0%)	1 (2.7%)	0.190
CI probable	12 (12.0%)	11 (17.5%)	1 (2.7%)	0.028
No CI	58 (58.0%)	43 (68.2%)	15 (40.5%)	0.007
<b>Origen de la CI probada</b>				
Infección intra-abdominal <sup>h</sup>	20 (66.7%)	6 (66.7%)	14 (66.7%)	0.002
Infección de prótesis(non-catheter) <sup>i</sup>	3 (10.0%)	-	3 (14.3%)	0.022
Empiema	2 (6.7%)	1 (11.1%)	1 (4.8%)	0.700
Otros <sup>j</sup>	5 (16.7%)	2 (22.2%)	3 (14.3%)	0.441

<b>Candida spp. en CI probada</b>				
<i>Candida albicans</i>	21 (70.0%)	8 (88.9%)	13 (61.9%)	0.183
<i>Candida glabrata</i>	4 (13.3%)	1 (11.1%)	3 (14.3%)	0.815
<i>Candida parapsilosis</i>	2 (6.7%)	-	2 (9.5%)	0.326
Otras especies de <i>Candida</i>	3 (9.9%)	-	3 (9.9%)	0.495
<b>Potenciales causas de falsos-positivos</b>				
Trasfusión derivados sangre	50 (50.0%)	34 (54.0%)	16 (43.2%)	0.300
Cirugía abdominal en 48 h previas	49 (49.0%)	37 (58.7%)	2 (5.4%)	0.011
Piperacilina/tazobactam	38 (38.0%)	26 (41.3%)	12 (32.4%)	0.379
Albumina	30 (30.0%)	23 (36.5%)	7 (18.9%)	0.05
HFVVC	25 (25.0%)	22 (34.9%)	3 (8.1%)	0.003
Bacteriemia <sup>k</sup>	22 (22.0%)	17 (27.0%)	5 (13.5%)	0.116
Bilirrubina $\geq 10 \times 1.1$	5 (5.0%)	3 (4.8%)	2 (5.4%)	0.887
Inmunoglobulina IV	6 (6.0%)	4 (6.3%)	2 (5.4%)	0.848
Amoxicilina/clavulánico	4 (4.0%)	2 (3.2%)	2 (5.4%)	0.583
Col multifocal por <i>Candida</i>	43 (43.0%)	27 (42.9%)	16 (43.2%)	0.970
<b>Tratamiento antifúngico empírico</b>				
Antifúngico, n (%)				
Equinocandinas	73 (73.0%)	53 (84.1 %)	20 (54.0%)	0.001
Fluconazol	20 (20.0%)	8 (12.7%)	12 (32.4%)	0.017
Anfotericina B	5 (5%)	1 (1.6%)	4 (10.8%)	0.041
Otros azoles	2 (2.0%)	1 (1.6%)	1 (2.7%)	0.700
Total (días tto) mediana [IQR]	10.0 [4.2-15.0]	9.0 [4.0-12.0]	12.0 [5.5-21.5]	0.014
CI probada	12 [4.0-21.0]	10.0 [2.0-18.0]	13.0 [6.5-21.5]	0.209
CI probable	10.5 [7.0-14.7]	10.0 [7.0-14.0]	26.0 <sup>l</sup>	0.167
Sin CI	8.5 [4.0-12.0]	8.0 [4.0-11.0]	10.0 [4.0-16.0]	0.230
Equinocandinas	10.0 [6.0-14.0]	9.0 [5.0-12.0]	12.0 [7.2-19.7]	0.027
Fluconazol	10.5 [3.2-25.0]	7.0 [3.2-13.2]	14.5 [3.2-26.0]	0.427
Anfotericina B	4.0 [3.5-21.0]	4.0 <sup>l</sup>	11.0 [3.2-22.5]	0.800
<b>Criterios de sepsis</b>				
Sepsis	35 (35.0%)	15 (23.8%)	20 (54.1%)	0.020
Sepsis grave	24 (24.0%)	12 (19.0%)	12 (32.4%)	0.130
Shock séptico	30 (30.0%)	27 (42.9%)	3 (8.1%)	<0.001
Fallo multiorgánico	11 (11.0%)	9 (14.3%)	2 (5.4%)	0.171
<b>Mortalidad total</b>	<b>31 (31.0%)</b>	<b>27 (42.9%)</b>	<b>4 (10.8%)</b>	<b>0.001</b>
No CI	16 (27.6%)	15 (20.8%)	1(2.7%)	0.035
CI probada	7 (23.3%)	5 (55.5%)	2 (9.5%)	0.006
CI probable	8 (66.7%)	7 (63.6%)	1 (100.0%)	0.460
<b>Modelos de combinación de CAGTA y BDG en CI probada</b>				
<b>Modelo 1</b>				
Sensibilidad % (95% CI)	96.7 (80.9-99.8)	100.0 (62.9-99.0)	95.2 (74.1-99.7)	-
Especificidad % (95% CI)	47.1 (35.4-59.2)	42.6 (29.5-56.7)	62.5 (35.9-83.7)	-
VPP % (95% CI)	43.9 (31.9-56.6)	22.5 (11.4-38.9)	76.9 (55.9-90.2)	-
VPN % (95% CI)	97.1 (82.9-99.8)	100 (82.2-99.6)	90.9 (57.1-99.5)	-
Precisión % (95% CI)	62.0 (51.7-71.4)	50.8 (38.0-63.5)	81.1 (64.3-91.4)	-

Modelo 2				
Sensibilidad % (95% CI)	83.3 (64.5-93.7)	88.9 (50.7-99.4)	80.9 (57.4-93.7)	-
Especificidad % (95% CI)	64.3 (51.9-75.1)	59.3 (45.1-72.1)	81.2 (53.7-95.0)	-
VPP % (95% CI)	50.0 (35.7-64.3)	26.7 (13.0-46.2)	85.0 (61.1-96.0)	-
VPN % (95% CI)	90.0 (77.4-96.3)	97.0 (82.5-99.8)	76.5 (49.8-92.2)	-
Precisión % (95% CI)	70.0 (59.9-78.5)	63.5 (50.3-75.0)	81.1 (64.3-91.4)	-

<sup>a</sup>EAT: Tratamiento antifúngico empírico. <sup>b</sup>CI: candidiasis invasiva. <sup>c</sup>Cirugía abdominal de alto riesgo:

incluye peritonitis terciaria, pérdida de anastomosis, perforación digestiva recurrente y pancreatitis necrotizante.

<sup>d</sup> Paciente inmunodeprimido incluyeron pacientes onco-hematológicos, paciente con TOS y otros. <sup>e</sup> 19 (63.3%) infección intra-abdominal y 3 (10.0%) infección de prótesis vasculares (no catéter). <sup>f</sup> 2 (6.7%) candidemias relacionadas con el catéter (1 [11.1%] en pacientes de UCI y 1 [4.8%] en pacientes no-UCI), and 1 (3.3%) candidemia primaria (1 [4.8%] en pacientes no-UCI). <sup>g</sup> 1 (3.3%) candidemia relacionada a infección intra-abdominal (1 [4.8%] en paciente no-UCI). <sup>h</sup> 19 (63.3%) infección intra-abdominal incluyendo: peritonitis, absceso intra-abdominal y drenaje intra-abdominal colocado hace <24 horas, (6 [66.7%] en pacientes de UCI y 13 [61.9%] en pacientes no-UCI); <sup>i</sup> 3 (10.0%) infección de prótesis vasculares (no-catéter) (3 [14.3%] en pacientes no-UCI), incluyendo 1 (4.8%) infección de marcapasos, 1 (4.8%) by-pass de aorta-abdominal y 1 (4.8%) by-pass vascular periférico. <sup>j</sup> Otros: 1 (3.3%) meningitis (1 [11.1%] en paciente de UCI); 1 (3.3%) infección urinaria (1 [4.8%] en paciente no-UCI), 2 (6.7%) candidemias relacionadas con el catéter (1 [11.1%] en paciente de UCI y 1 [4.8%] en paciente no-UCI), y 1 (3.3%) candidemia primaria (1 [4.8%] en paciente no-UCI). <sup>k</sup> Bacteriemia [n= 22, (22%)] debidas a Gram+: 13 (59.1%) incluyeron 4 (18.2%) *Enterococcus* spp; 4 (18.2%) *Staphylococcus Coagulasa* Negativos; 3 (13.6%) *Staphylococcus aureus* y 2 (9.1%) aslamientos mixtos Gram negativos + *Enterococcus* spp. <sup>l</sup> Sólo un caso.

La tabla 2 y el material suplementario muestran el comportamiento de los biomarcadores solos y en combinación y considerando CI como probadas y como probada más probable. En cuanto a CAGTA, la sensibilidad estuvo entre 53.3% y 60.0% y los VPNs de 72.7% a 83.6% cuando los resultados se evaluaron en los tres días diferentes y cuando se consideraron los casos de CI probada y CI probada más probable. No hubo ninguna mejora demostrada en la sensibilidad y VPN cuando se analizaron los tres días de muestreo juntos con el modelo 1 o con el modelo 2 (sensibilidad 60.0% y VPN 83%).

Por otro lado, el BDG rindió mejores resultados cuando los tres días fueron analizados juntos con el modelo 1 (sensibilidad 86.7% y VPN 90.2%) que con el modelo 2 (sensibilidad 73.3% and VPN 86.0%) o con cada punto de tiempo independientemente (ver material suplementario en el anexo).

Sin embargo, los resultados fueron mejores cuando ambos test se usaron en combinación (sensibilidad 80.0% a 93.3% y VPN 87.5% a 95.6%). Cuando las tres muestras se se analizaron juntas el modelo 1 rindió una sensibilidad del 96.7% con un VPN del 97.1%. sin embargo, con el modelo 2, ni la sensibilidad ni el VPN mejoró (sensibilidad 83.3% y VPN 90%).

Como se esperaba, la inclusion de los casos de CI probable disminuyó la sensibilidad y el VPN pero incrementó la especificidad y el VPP. En este escenario, solo el modelo 1 mostró una sensibilidad y un VPN por encima del 90% (ver material suplementario en el anexo).

**Tabla 2.** Análisis para CI probada del resultado de los biomarcadores solos o en combinación y requiriendo solo una resultado positivo (Modelo 1) o al menos dos resultados positivos consecutivos (Modelo 2) para el total de los días (día 0, día +3 y día +5 de iniciar el tratamiento antifúngico empírico).

	Sensibilidad % (95% IC)	Especificidad % (95% IC)	VPP % (95% IC)	VPN % (95% IC)
<b>Modelo 1 CAGTA</b>	60.0 (40.7-76.8)	85.7 (74.8-92.6)	64.3 (44.1-80.7)	83.3 (72.3-90.7)
<b>Modelo 2 CAGTA</b>	60.0 (40.7-76.8)	87.1 (76.5-93.6)	66.7 (46.0-82.8)	83.6 (72.6-90.9)
<b>Modelo 1 BDG</b>	86.7 (68.4-95.6)	52.9 (40.6-64.8)	44.1 (31.4-57.5)	90.2 (75.9-96.8)
<b>Modelo 2 BDG</b>	73.3 (53.8-87.0)	70.0 (57.1-80.1)	51.2 (35.7-66.4)	86.0 (73.6-93.3)
<b>Modelo 1 CAGTA/BDG</b>	96.7 (80.9-99.8)	47.1 (35.4-59.4)	43.9 (31.9-56.6)	97.1 (82.9-99.8)
<b>Modelo 2 CAGTA/BDG</b>	83.3 (64.5-93.7)	64.3 (51.9-75.1)	50.0 (35.7-64.3)	90.0 (77.4-96.3)

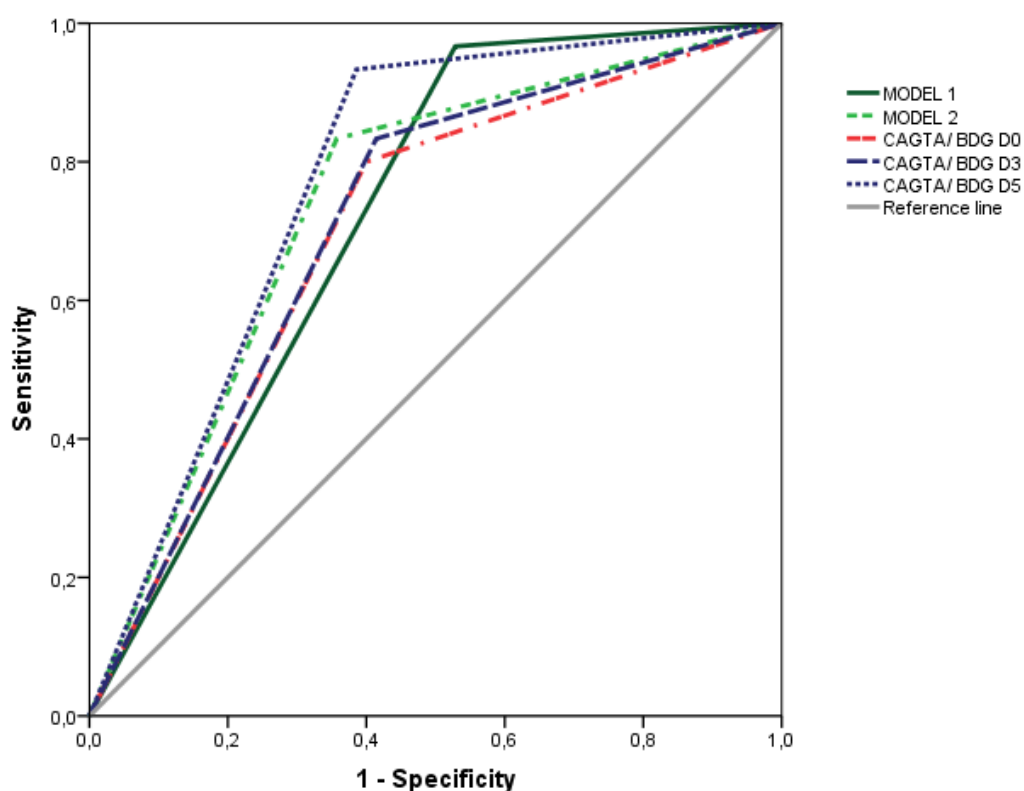
La combinación CAGTA/BDG fue considerada positiva si al menos CAGTA y/o BDG fue positivo.

CAGTA: *Candida albicans* germ tube antibody. BDG: (1-3)-beta-D-glucano.

(Los datos para cada punto de tiempo (día 0, día 3 y día 5 de iniciado el tratamiento antifúngico empírico) para CAGTA, BDG y para las combinaciones CAGTA y BDG están disponibles en el material suplementario incorporado en el anexo. También aportamos los mismos resultados analizando los casos de CI probada juntos con los casos probables).

La curva ROC (Figura 1) de los biomarcadores combinados (modelo 1 o 2 y para cada punto de tiempo -días 0, +3 y +5) mostraron que las mejores sensibilidades fueron las aportadas con la combinación de CAGTA y BDG usando el modelo 1 (sensibilidad 96.7%, especificidad 47.1%; AUC: 0.719) y con la combinación de CAGTA y BDG en el día +5 (sensibilidad 93.3%; especificidad 61.4%; y, AUC: 0.774, respectivamente).

**Figura 1** La curva ROC muestra la eficacia de los biomarcadores solos o en combinación y requiriendo solo 1 resultado positivo (Modelo 1) o al menos 2 resultados positivos consecutivos (Modelo 2) para el total de los días (día 0, día +3 y día +5 de iniciado el tratamiento antifúngico empírico).



(a) Modelo 1 (no-restrictivo): si al menos 1 resultado positivo en CAGTA o BDG era positivo en cualquiera de los tres días. (b) Modelo 2 (parcialmente restrictivo): si al menos 2 resultados positivos consecutivos en CAGTA y/o BDG fueran positivos.

El modelo 1 rindió S: 96.7% y E: 47.1%, AUC: 0.732 [0.633-0.830]. El modelo 2 mostró S: 83.3 % y E: 64.3%; AUC: 0.787 [0.694-0.880]. CAGTA/ BDG día 0 obtuvo S: 80.0% y E: 60.0%; AUC: 0.750 [0.651-0.848]. CAGTA/ BDG día +3, S: 83.3% y E: 58.6%; AUC: 0.753 [0.655-0.851]. CAGTA/ BDG día +5, S: 93.3% y E: 61.4%; AUC: 0.785 [0.693-0.877].

La tabla 3 muestra el comportamiento de los biomarcadores para el total de la población y en los pacientes de UCI frente a no-UCI. Del total, el 96.7% de las CI probadas (29/30 casos) cumplieron la premisa del modelo 1, mientras que sólo el 83.3% (25/30 casos) cumplieron las condiciones del modelo 2. Cuando se consideraron también los casos de CI probable, la combinación de los biomarcadores fue positiva en 10/12 casos (83.3%) en ambos modelos. Los tres resultados clasificados como potenciales falsos negativos (todos los biomarcadores negativos) ocurrieron en pacientes que cumplieron con los criterios de las definiciones (1 CI probada y 2 probables), aunque el significado de los aislamientos de *Candida* fueron dudosos. El primer caso correspondió a una *C. glabrata* recuperada de un cultivo mixto procedente de una muestra de colecistostomía percutánea en un paciente con pancreatitis (clasificado como CI probada de acuerdo con las definiciones). Los otros dos correspondieron a *Candida* spp. (de dos lugares no estériles) recuperado de muestras respiratoria en un paciente con infección por VIH con una candidiasis oral severa y una esofagitis probable, y de un paciente con pancreatitis severa. Dado su mal estado clínico, a ambos pacientes se les administró antifúngico sistémico, y los casos fueron clasificados como CI probable.

Entre los pacientes sin CI, todos los biomarcadores fueron negativos en 31/58 pacientes (53.4%), y hubo un total de 27 falsos-positivos. Los falsos positivos fueron más comunes en los pacientes de UCI (51.2%) que en los pacientes de otros servicios (33.3%). Las causas potenciales de falsos positivos tales como cirugía abdominal en las



48 horas previas (17), administración de albúmina (12) y HFVVC (11) fueron significativamente más comunes en la UCI. La colonización multifocal por *Candida* fue significativamente más común en los pacientes con CI probada (66.7%) o probable (100%), que en los pacientes sin infección (19%,  $P < 0.001$ ).

## DISCUSIÓN

Nuestro estudio sugiere que la combinación de CAGTA y BDG podría ser usado para retirar de forma segura antifúngicos en el día +5 en una sustancial proporción de pacientes (31%) que recibieron tratamiento antifúngico empírico, tanto en la UCI como en otros servicios.

Los expertos aceptan que la reducción del uso innecesario de antifúngicos debería ser uno de los principales retos de los programas de Antifungal Stewardship. El tratamiento antifúngico empírico cuenta con alrededor del 42% de los antifúngicos usados en los hospitales terciarios [2, 97, 131, 246, 283] y es prescrito principalmente a los pacientes críticos ingresados en la UCI [146, 283, 284]. Aunque las guías clínicas apoyan y recomiendan estas terapias en los pacientes de alto riesgo [89], la prescripción en este grupo de pacientes fue más inapropiado que en otros (57% en nuestra experiencia), principalmente debido a la excesiva duración del tratamiento [2] y a la incorrecta indicación, como se ha demostrado recientemente en otros sitios [2, 131, 146, 246].

Tabla 3. Resultados de los biomarcadores según modelos de combinación en función de la presencia o no de candidiasis invasiva.

	CI probada (n=30)*			CI probable (n=12)			CI probada + probable (n=42)*			Sin CI (n=58)*		
	Total (n=30)	UCI (n=9)	No-UCI (n=21)	Total (n=12)	UCI (n=11)	No-UCI (n=1)	Total (n=42)	UCI (n=20)	No-UCI (n=22)	Total (n=58)	UCI (n=43)	No-UCI (n=15)
<b>Al menos 1 BM positivo (Modelo 1)</b>	29 (96.7%)	9 (100.0%)	20 (95.2%)	10 (83.3%)	9 (81.8%)	1 (100.0%)	39 (92.9%)	18 (90.0%)	21 (95.5%)	27 (46.6%)	22 (51.2%)	5 (33.3%)
<b>Al menos 2 BMs consecutivos positivos (Modelo 2)</b>	25 (83.3%)	8 (88.9%)	17 (81.0%)	10 (83.3%)	9 (81.8%)	1 (100.0%)	35 (83.3%)	17 (85.0%)	18 (81.8%)	15 (25.9%)	13 (30.2%)	2 (13.3%)
<b>Todos los BMs negativos</b>	1 (3.3%)	0 (0.0%)	1 (4.8%)	2 (16.7%)	2 (18.2%)	0 (0.0%)	<b>3 (7.1%)</b>	<b>2 (10.0%)</b>	<b>1 (4.5%)</b>	31 (53.4%)	21 (48.8%)	10 (66.7%)

BM: biomarcador de candidiasis invasiva (CAGTA y BDG)

CI: candidiasis invasiva

\*:  $P < 0.05$

Todos los expertos aceptan que la reducción del uso innecesario de antifúngicos debería ser el objetivo principal de los programas de “antifungal stewardship”. El tratamiento antifúngico empírico supone cerca del 42% todos los antifúngicos empleados en un hospital terciario [2, 97, 131, 246, 283]. Los principales usuarios del tratamiento antifúngico empírico son los pacientes críticos ingresados en las UCIs [146, 283, 284]. Aunque las guías clínicas apoyan y recomiendan la terapia antifúngica empírica en los pacientes de alto riesgo [89], las auditorías demuestran que esta indicación tiene un elevado porcentaje de uso inapropiado, suponiendo en nuestra experiencia un 57%. La principal razón del uso inadecuado del tratamiento empírico es la excesiva duración del tratamiento y la incorrecta indicación, como recientemente ha sido demostrado por otros autores [2, 131, 146, 246].

Nuestros resultados demuestran que el problema en la UCI (alta sospecha y relative baja prevalencia de infección entre los pacientes tratados: 14.3% en nuestra serie) difiere de los otros servicios (baja sospecha y alta prevalencia de infección en los pacientes tratados empíricamente: 56.7% en nuestra serie). De hecho, el mayor ratio de mortalidad se produce en las candidemias que se desarrollan en los servicios de medicina interna, más que en las UCIs en algunas series [110]. Los pacientes de los servicios de cirugía y de los servicios médicos podrían ser potadores de muy significantes factores de riesgo para el desarrollo de micosis invasivas [112, 225, 285, 286]. Aunque solo incluimos pacientes con tratamiento antifúngico, nuestro estudio es uno de los pocos que han analizados ambos tipos de poblaciones, reflejando el uso de los antifúngicos empíricos en la vida real en una institución terciaria.

Nuestro estudio también muestra que la CI se probó finalmente solo en el 30% de los pacientes tratados con antifúngico empírico (42% si incluimos los pacientes con CI probable), demostrando que la población incluida en nuestra serie era de alto riesgo. Según esto, la indicación de iniciar antifúngicos precozmente podría estar justificado en la mayoría de los casos [56, 269]. El principal problema es que los antifúngicos se mantienen más de 10 días en los pacientes sin CI (11.7 días en los servicios de no-UCI), con la toxicidad y gastos innecesarios asociados. La baja sensibilidad de los hemocultivos complica la decisión de parar el tratamiento antifúngico de forma segura. Por lo que, son necesarias urgentemente alternativas que no implique esperar a los resultados de cultivos positivos [131]. El resultado más interesante de nuestro estudio fue que la combinación de CAGTA y BDG negativos podrían tener la capacidad de retirar antifúngicos empíricos en el 53% de los pacientes sin CI (el 48.8% en UCIs y el 66.7% en no-UCIs) a los 5 días de iniciado, con una sensibilidad de al menos el 97%.

Los pocos estudios que han analizado CAGTA lo han hecho principalmente en pacientes onco-hematológicos y en pacientes críticos ingresados en la UCI. CAGTA ha demostrado sensibilidades entre el 84-87% y especificidades del [97, 203]. Otra potencial ventaja es el bajo coste de la técnica y su potencial utilidad para discriminar colonización de infección y candidemia con candidiasis invasiva profunda de la candidemia relacionada con el catéter [203, 225]. Cuando CAGTA se usó solo, encontramos una sensibilidad del 60%, una especificidad del 85% y un VPN del 83%. La ligera disminución en la especificidad encontrada en nuestro trabajo en

comparación con estudios previos probablemente es debido a las diferentes poblaciones del estudio (tratamiento antifúngico empírico frente a pacientes con candidemia) [257]. Además, encontramos una pequeña variación del CAGTA a lo largo de los días testados secuencialmente. Interesantemente, el 13% de los pacientes (4) con CI tuvieron un CAGTA inicial negativo que se positivizó hasta el quinto día. Otros autores han descrito este mismo patrón cinético en el 31.8% de los pacientes de UCI [267].

Diferentes estudios han examinado el papel del BDG para el diagnóstico de la CI y han informado una media de sensibilidad del 75% y una especificidad del 80% [67, 201]. En nuestro estudio, la sensibilidad del BDG fue del 96.7% con una especificidad del 47.1%. En general, la especificidad y el VPP fue inferior en los pacientes ingresados en la UCI (especificidad 42.6% y VPP en la UCI frente a 62.5% y 76.9% en los servicios no-UCI). Este hallazgo, el cual ha sido informado en otros sitios, podría ser debido a la mayor exposición a causas de falsos positivos en las UCIs (51.2% en la UCI frente a 33.3% en no-UCI) [207, 255]. El BDG es una herramienta prometedora en la candidiasis intra-abdominal, como ha demostrado Tissot et al, quien mostró que dos BDG consecutivos positivos tenían una sensibilidad y especificidad del 65% y 78%, respectivamente [201].

Nuestro estudio demuestra que la opción con mayor VPN es la combinación CAGTA/BDG. Según esto, la combinación del CAGTA y el BDG podría ser una herramienta muy prometedora, no para el diagnóstico de la CI, sino para su exclusión en

los pacientes que reciben tratamiento antifúngico empírico. Los mejores resultados (sensibilidad 96.7% y VPN 97.1%) fueron obtenidos cuando en la combinación se consideró positivo si alguno de los 6 test fueran positivos (CAGTA y BDG en los días 0, +3, o +5). Con este modelo restrictivo (modelo 1), solo 1 paciente con potencial CI probada (*Candida* recuperada de una colecistectomía con múltiples aislamientos de bacterias) tuvo resultados negativos. Este paciente estuvo ingresado en un servicio medico, así la sensibilidad y el VPN de el modelo fue del 100% para los pacientes de UCI y del 95.2% y el 90.9% para los pacientes de otros servicios. Estudios previos enfatizaron la superioridad del valor diagnóstico de la combinación del CAGTA con el BDG [97, 257, 275, 287].

Nuestros resultados sugieren que la estrategia más efectiva sería probablemente aportar al clínicos los resultados de los biomarcadores en el día +5 de iniciado en tratamiento empírico (sensibilidad 93.3% y VPN 95.6%), cuando los resultados definitivos de los hemocultivos están disponibles. Nuestra aproximación podría hacer posible la retirada de antifúngico empírico en 31 pacientes que tuvieron todos los biomarcadores negativos y en los que no se probó CI. Considerando que la media de duración del tratamiento fue de 10 días, calculamos que evitando 5 días de tratamiento en 31 pacientes podría suponer el 15.6% de los antifúngicos usados en este estudio (aproximadamente 78,000€ de coste). Además, ya que nuestro hospital consume aproximadamente 3 millones de € en antifúngicos por año, un ahorro del 15% podría permitirnos reducir el coste en 468,000 € por año. El relativo bajo coste de estos 6 test diagnósticos para 100 pacientes (cercano a 12,000 €; 10 € por cada CAGTA

y 30 € por cada BDG) refleja la coste-efectividad de nuestra aproximación. Diseños más efectivos, tal como realizar los biomarcadores antes o solo realizarlo el día +5 podrían ser estudiados. En nuestra experiencia, realizando los test solo en el día +5, se obtuvo una sensibilidad del 93.3% y un VPN del 95.6%. No se observaron diferencias cuando analizamos los test en los días 3 y 5 (sensibilidad 93.3% y VPN 94.9%).

Nuestro estudio es objeto de una serie de limitaciones. La primera es el alto ratio de falsos positivos usando el modelo de combinación no-restrictivo. En total, los falsos positivos supusieron el 55% de los resultados positivos en los pacientes de UCI y el 19% en otros servicios. Este ratio podría ser reducido; sin embargo, como nuestro objetivo fue incluir una estrategia de combinación de biomarcadores en nuestro modelo de antifungal stewardship, la seguridad de los pacientes era nuestra principal meta. Si bien es útil saber que la administración de albúmina o inmunoglobulinas iv, terapia de sustitución renal, y colonización multifocal por *Candida* podrían render resultados falsos positivos en el BDG, los pacientes que reciben estas terapias son a menudo pacientes de alto riesgo de [201, 218]. Sin embargo, el riesgo de inducir un tratamiento innecesario existe y no podemos excluir que una interrupción de antifungicos en pacientes sin CI no cause ningún daño por lo que, en nuestra opinión, es necesario un ensayo clínico randomizado. Hasta entonces, la implicación de los resultados de los biomarcadores en las decisiones terapéuticas deberían ser manejadas por expertos en el campo [203, 246, 288]. Además, no hemos analizado el potencial impacto de los diferentes grados de colonización por *Candida* en los niveles de los biomarcadores.

La segunda limitación es que el estudio fue realizado en un solo centro, aunque ello refleja el uso real de antifúngicos en un hospital general. Sin embargo, nuestros resultados deberían ser replicados en otros sitios antes de que nuestras conclusiones puedan ser incorporadas dentro de las estrategias de antifúngicos.

Finalmente, una tercera posible limitación es la dificultad de diagnosticar la candidiasis intra-abdominal. Aunque hemos sido muy estrictos con los criterios y solo considerado como infección probada cuando *Candida* fue recuperada de muestras significantes, el papel de los cultivos polimicrobianos muchas veces es difícil de establecer.

En conclusión, las determinaciones seriadas de CAGTA y BDG durante los primeros días del tratamiento antifúngico empírico tiene muy alta sensibilidad y VPN. Si se confirma en ensayos clínicos randomizados, esta estrategia podría ser usada para retirar tratamientos antifúngicos en al menos el 31% de los pacientes. Esto podría ser también usado como herramienta complementaria en los programas de antifungal stewardship.

## AGRADECIMIENTOS

Los kits de CAGTA fueron facilitados por Joaquín Mendoza (director de Vircell, S.L. (Vircell Microbiologist S.L., Granada, España).

Este trabajo ha sido financiado mediante becas del Fondo de Investigación Sanitaria (becas números PI11/00167 y PI10/02868). M. Carmen Martínez-Jiménez ha sido financiada por la Fundación para la Investigación Biomédica del Hospital Gregorio



Marañón. J. Guinea ha sido financiado por un contrato Miguel Servet del FIS (MS09/00055). La Fundación para la Investigación Biomédica del Hospital Gregorio Marañón (FIBHGM) fue el promotor del estudio (ref. EONC002-2013).

José María Bellón de la Fundación para la Investigación Biomédica del Hospital Gregorio Marañón contribuyó al análisis estadístico.

Agradecimientos al personal de enfermería del Hospital General Universitario Gregorio Marañón. Sin su colaboración este estudio no se podría haber llevado a cabo. Con mención especial de: Leonor Azcarate Galbis, Carmen Sainz Pardo Rodríguez, Dolores González Baz, Ana María Fernández García. Carmen González García, Francisca Añez Rapado, Ana María Hernández Gamo, Sonia Montoto Bermejo, Carmen Heras Escobar, Mar Díaz Salcedo, Aurelia Martínez Pérez de Tudela, Mar Sánchez Ayuso, Amalia Checa Amaro, Ana I Viñaras Fragueiro, Gema Moreno Fernández, Leticia Cabeza Tejeda, Carolina Lerin Cuevas, Pablo Lerma Lara, Sara Carrasco Harinero, Miguel López Díaz, Diana de Agustín Subinas, Raquel de Blas Hernando, Manuela Rodríguez Ramos, Raúl Merchán Arjona, Sara Robles Carmenes, Antonio Revuelta Lema, Carmen Gómez Aguado, Elena Pérez Menéndez, Susana Velasco Cabezas, Rosa María Menéndez Tarín, Patricia Sánchez Sinoco, Dolores Maestre Ortiz y otros.

## CONCLUSIONES

1. En nuestra experiencia, el 42% de los pacientes con candidemia tuvieron candidemia relacionada con el catéter y candidemia primaria, y el restante 58% de las candidemias fueron debidas a infecciones profundas, principalmente las asociadas a infecciones intraabdominales y a infecciones del tracto urinario.

2. En pacientes con candidemia, la presencia de anticuerpos antimicelio (CAGTA positivo) frente a *Candida* en muestras de suero sugiere candidiasis invasiva con infección de órganos y tejidos profundos.

3. La sensibilidad del test de los anticuerpo antimicelio (CAGTA) para la detección de candidemia, aunque fue diseñado para *Candida albicans* también es alta para otras especies de *Candida*, con la excepción de *Candida tropicalis* (30%).

4. Para el diagnóstico de candidemia, la determinación de los tests anticuerpos antimicelio (CAGTA), (1,3)-beta-D-glucano (BDG), antígeno manano (MN) y anticuerpos antimanano (AMN) de forma individual no son los ideales (sensibilidades se encuentran entre 51.6% y 83.9%). Sin embargo, la sensibilidad de la combinación CAGTA y BDG o CAGTA y MN para el diagnóstico de candidemia fue del 97%.

5. En pacientes sépticos, la combinación de CAGTA y BDG y de CAGTA y MN, mostraron un elevado valor predictivo negativo (>99%) para el diagnóstico de candidemia. Dado que únicamente las combinaciones que contuvieron BDG en su fórmula fueron capaces de detectar todas las especies de *Candida*, recomendamos el uso de la combinación CAGTA y BDG, con los puntos de corte de 1/80 y 80 pg/mL,

respectivamente, como tests habituales para la exclusión de candidemia y de candidiasis invasiva.

6. La candidiasis invasiva sólo fue probada en el 30% de los pacientes que recibieron tratamiento antifúngico empírico. Esta es más prevalente en los pacientes no-UCI (56.7%) que entre los pacientes de UCI (14.3%).

7. Las principales indicaciones para la prescripción de tratamiento antifúngico empírico fueron los pacientes con cirugía abdominal de alto riesgo y la sepsis en pacientes no quirúrgicos. Las equinocandinas supusieron un 73% de los tratamientos antifúngicos (84% en la UCI y el 54% en otros servicios) y fue mantenido durante una media de 10 días.

8. En pacientes con sospecha de candidiasis invasiva en los que se ha iniciado un tratamiento antifúngico empírico, la determinación seriada de la combinación de CAGTA y BDG en los primeros cinco días obtuvo muy alto valor predictivo negativo, del 100% en los pacientes ingresados en la UCI.

9. La estrategia de la determinación seriada de CAGTA y BDG en los primeros cinco días de tratamiento podría permitir la retirada segura del tratamiento antifúngico empírico en un tercio de los pacientes.

10. La estrategia de la determinación seriada de CAGTA y BDG podría ser útil como herramienta complementaria en los programas de Antifungal Stewardship.

## **REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

- 1 Lopez-Medrano F, San Juan R, Lizasoain M, et al. A non-compulsory stewardship programme for the management of antifungals in a university-affiliated hospital. *Clin Microbiol Infect.* 2013; **19**: 56-61.
- 2 Valerio M, Rodriguez-Gonzalez CG, Munoz P, Caliz B, Sanjurjo M, Bouza E. Evaluation of antifungal use in a tertiary care institution: Antifungal stewardship urgently needed. *The Journal of antimicrobial chemotherapy.* 2014; **69**: 1993-1999.
- 3 Micallef C, Aliyu SH, Santos R, Brown NM, Rosembert D, Enoch DA. Introduction of an antifungal stewardship programme targeting high-cost antifungals at a tertiary hospital in cambridge, england. *The Journal of antimicrobial chemotherapy.* 2015.
- 4 Hoog GS, Guarro J, Gené J, Figueras MJ. Atlas of clinical fungi. In: CBS, ed. 2011.
- 5 Spampinato C, Leonardi D. Candida infections, causes, targets, and resistance mechanisms: Traditional and alternative antifungal agents. *BioMed research international.* 2013; **2013**: 204237.
- 6 Quindos G. Epidemiology of candidaemia and invasive candidiasis. A changing face. *Revista iberoamericana de micología.* 2014; **31**: 42-48.
- 7 Pfaller MA, Moet GJ, Messer SA, Jones RN, Castanheira M. Candida bloodstream infections: Comparison of species distributions and antifungal resistance patterns in community-onset and nosocomial isolates in the sentry antimicrobial surveillance program, 2008-2009. *Antimicrobial agents and chemotherapy.* 2011; **55**: 561-566.
- 8 Guarro J. [taxonomy and biology of fungi causing human infection]. *Enfermedades infecciosas y microbiología clínica.* 2012; **30**: 33-39.
- 9 Peman J, Martin-Mazuelos E, Rubio-Calvo M. Guía práctica de identificación y diagnóstico en micología clínica. In: Micología RId, ed. *Identificación de levaduras.* 2ª edn. Bilbao 2007.
- 10 Ostrosky-Zeichner L. Invasive mycoses: Diagnostic challenges. *Am J Med.* 2012; **125**: S14-24.
- 11 Griffin AT, Hanson KE. Update on fungal diagnostics. *Current infectious disease reports.* 2014; **16**: 415.
- 12 Fortun J, Meije Y, Buitrago MJ, et al. Clinical validation of a multiplex real-time pcr assay for detection of invasive candidiasis in intensive care unit patients. *The Journal of antimicrobial chemotherapy.* 2014; **69**: 3134-3141.
- 13 Mylonakis E, Clancy CJ, Ostrosky-Zeichner L, et al. T2 magnetic resonance assay for the rapid diagnosis of candidemia in whole blood: A clinical trial. *Clin Infect Dis.* 2015; **60**: 892-899.
- 14 Criseo G, Scordino F, Romeo O. Current methods for identifying clinically important cryptic candida species. *J Microbiol Methods.* 2015; **111**: 50-56.
- 15 Sow D, Fall B, Ndiaye M, et al. Usefulness of maldi-tof mass spectrometry for routine identification of candida species in a resource-poor setting. *Mycopathologia.* 2015.
- 16 Ghosh AK, Paul S, Sood P, et al. Matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry for the rapid identification of yeasts causing bloodstream infections. *Clin Microbiol Infect.* 2015; **21**: 372-378.
- 17 Panda A, Ghosh AK, Mirdha BR, et al. Maldi-tof mass spectrometry for rapid identification of clinical fungal isolates based on ribosomal protein biomarkers. *J Microbiol Methods.* 2015; **109**: 93-105.
- 18 Posteraro B, Efremov L, Leoncini E, et al. Are the conventional commercial yeast identification methods still helpful in the era of new clinical microbiology diagnostics? A meta-analysis of their accuracy. *Journal of clinical microbiology.* 2015.

- 19 Peman J, Quindos G. *Breve clasificación y taxonomía de los hongos patógenos. Origen natural de los agentes infecciosos fúngicos y formas de transmisión a los huéspedes. Levaduras. Mohos. Otros.*: SEFH, SEIMC and Pfizer. 2010.
- 20 Ruiz-Herrera J, Elorza MV, Valentin E, Sentandreu R. Molecular organization of the cell wall of candida albicans and its relation to pathogenicity. *FEMS yeast research*. 2006; **6**: 14-29.
- 21 Chaffin WL. Candida albicans cell wall proteins. *Microbiology and molecular biology reviews : MMBR*. 2008; **72**: 495-544.
- 22 Bartha I, Fellay J. Adaptation on a genomic scale. *eLife*. 2015; **4**: e06193.
- 23 Pruszcz LP, Nemeth T, Gacser A, Gabaldon T. Unexpected genomic variability in clinical and environmental strains of the pathogenic yeast candida parapsilosis. *Genome biology and evolution*. 2013; **5**: 2382-2392.
- 24 Selmecki A, Forche A, Berman J. Genomic plasticity of the human fungal pathogen candida albicans. *Eukaryot Cell*. 2010; **9**: 991-1008.
- 25 Ahmad KM, Kokosar J, Guo X, Gu Z, Ishchuk OP, Piskur J. Genome structure and dynamics of the yeast pathogen candida glabrata. *FEMS yeast research*. 2014; **14**: 529-535.
- 26 Forche A, May G, Magee PT. Demonstration of loss of heterozygosity by single-nucleotide polymorphism microarray analysis and alterations in strain morphology in candida albicans strains during infection. *Eukaryot Cell*. 2005; **4**: 156-165.
- 27 Ford CB, Funt JM, Abbey D, et al. The evolution of drug resistance in clinical isolates of candida albicans. *eLife*. 2015; **4**: e00662.
- 28 Sampaio P, Santos M, Correia A, et al. Virulence attenuation of candida albicans genetic variants isolated from a patient with a recurrent bloodstream infection. *PLoS One*. 2010; **5**: e10155.
- 29 Lopez-Ribot JL, Casanova M, Murgui A, Martinez JP. Antibody response to candida albicans cell wall antigens. *FEMS immunology and medical microbiology*. 2004; **41**: 187-196.
- 30 Chaffin WL, Lopez-Ribot JL, Casanova M, Gozalbo D, Martinez JP. Cell wall and secreted proteins of candida albicans: Identification, function, and expression. *Microbiology and molecular biology reviews : MMBR*. 1998; **62**: 130-180.
- 31 Fradin C, Bernardes ES, Jouault T. Candida albicans phospholipomannan: A sweet spot for controlling host response/inflammation. *Seminars in immunopathology*. 2015; **37**: 123-130.
- 32 Pitarch A, Nombela C, Gil C. Prediction of the clinical outcome in invasive candidiasis patients based on molecular fingerprints of five anti-candida antibodies in serum. *Mol Cell Proteomics*. 2011; **10**: M110 004010.
- 33 Carlisle PL, Banerjee M, Lazzell A, Monteagudo C, Lopez-Ribot JL, Kadosh D. Expression levels of a filament-specific transcriptional regulator are sufficient to determine candida albicans morphology and virulence. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2009; **106**: 599-604.
- 34 Kadosh D, Johnson AD. Induction of the candida albicans filamentous growth program by relief of transcriptional repression: A genome-wide analysis. *Molecular biology of the cell*. 2005; **16**: 2903-2912.
- 35 Kaur R, Domergue R, Zupancic ML, Cormack BP. A yeast by any other name: Candida glabrata and its interaction with the host. *Curr Opin Microbiol*. 2005; **8**: 378-384.
- 36 Mayer FL, Wilson D, Hube B. Candida albicans pathogenicity mechanisms. *Virulence*. 2013; **4**: 119-128.

- 37 Jacobsen ID, Wilson D, Wachtler B, Brunke S, Naglik JR, Hube B. Candida albicans dimorphism as a therapeutic target. *Expert review of anti-infective therapy*. 2012; **10**: 85-93.
- 38 Ramage G, Rajendran R, Sherry L, Williams C. Fungal biofilm resistance. *International journal of microbiology*. 2012; **2012**: 528521.
- 39 Bhatt M, Sarangi G, Paty BP, et al. Biofilm as a virulence marker in candida species in nosocomial blood stream infection and its correlation with antifungal resistance. *Indian journal of medical microbiology*. 2015; **33 Suppl**: S112-114.
- 40 Sherry L, Rajendran R, Lappin DF, et al. Biofilms formed by candida albicans bloodstream isolates display phenotypic and transcriptional heterogeneity that are associated with resistance and pathogenicity. *BMC microbiology*. 2014; **14**: 182.
- 41 Tumbarello M, Posteraro B, Trecarichi EM, et al. Biofilm production by candida species and inadequate antifungal therapy as predictors of mortality for patients with candidemia. *Journal of clinical microbiology*. 2007; **45**: 1843-1850.
- 42 Albaina-Bacaicoa O. Caracterización de aislamientos atípicos de candida dubliniensis. *Departamento de Inmunología, Microbiología y Parasitología Immunologia, Microbiologia eta Parasitologia Saila*: Facultad de Medicina y Odontología. Universidad del Pais Vasco. 2012; 217.
- 43 Pei-Wen T, Yu-Ting C, Po-Chen H, Chung-Yu L. Study of candida albicans and its interactions with the host: A mini review. *Bio Medicine* 3. 2013; **3**: 51-64.
- 44 Schaller M, Borelli C, Kortling HC, Hube B. Hydrolytic enzymes as virulence factors of candida albicans. *Mycoses*. 2005; **48**: 365-377.
- 45 Ha JF, Italiano CM, Heath CH, Shih S, Rea S, Wood FM. Candidemia and invasive candidiasis: A review of the literature for the burns surgeon. *Burns : journal of the International Society for Burn Injuries*. 2011; **37**: 181-195.
- 46 Gow NA, Hube B. Importance of the candida albicans cell wall during commensalism and infection. *Curr Opin Microbiol*. 2012; **15**: 406-412.
- 47 Gow NA, van de Veerdonk FL, Brown AJ, Netea MG. Candida albicans morphogenesis and host defence: Discriminating invasion from colonization. *Nature reviews Microbiology*. 2012; **10**: 112-122.
- 48 Kumamoto CA. Inflammation and gastrointestinal candida colonization. *Curr Opin Microbiol*. 2011; **14**: 386-391.
- 49 Krause R, Zollner-Schwetz I, Salzer HJ, et al. Elevated levels of interleukin 17a and kynurenine in candidemic patients, compared with levels in noncandidemic patients in the intensive care unit and those in healthy controls. *The Journal of infectious diseases*. 2015; **211**: 445-451.
- 50 Sheppard DC, Filler SG. Host cell invasion by medically important fungi. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*. 2015; **5**: a019687.
- 51 Wilson D, Thewes S, Zakikhany K, et al. Identifying infection-associated genes of candida albicans in the postgenomic era. *FEMS yeast research*. 2009; **9**: 688-700.
- 52 Spellberg B, Archer G. Candida: What should clinicians and scientists be talking about? In: C.J. Archer, ed. *Candida and candidiasis*. 2<sup>a</sup> edn. United States of America: ASM press 2012; 1-8.
- 53 Eggimann P, Pittet D. Candida colonization index and subsequent infection in critically ill surgical patients: 20 years later. *Intensive care medicine*. 2014; **40**: 1429-1448.
- 54 Marcos-Zambrano LJ, Escribano P, Bouza E, Guinea J. [use of molecular typing tools for the study of hospital outbreaks of candidemia]. *Revista iberoamericana de micología*. 2014; **31**: 97-103.



- 55 Bassetti M, Mikulska M, Viscoli C. Bench-to-bedside review: Therapeutic management of invasive candidiasis in the intensive care unit. *Critical care*. 2010; **14**: 244.
- 56 Clancy CJ, Nguyen MH. Finding the "missing 50%" of invasive candidiasis: How nonculture diagnostics will improve understanding of disease spectrum and transform patient care. *Clin Infect Dis*. 2013; **56**: 1284-1292.
- 57 Leroy O, Gangneux JP, Montravers P, et al. Epidemiology, management, and risk factors for death of invasive candida infections in critical care: A multicenter, prospective, observational study in france (2005-2006). *Critical care medicine*. 2009; **37**: 1612-1618.
- 58 Meyer E, Geffers C, Gastmeier P, Schwab F. No increase in primary nosocomial candidemia in 682 german intensive care units during 2006 to 2011. *Euro surveillance : bulletin European sur les maladies transmissibles = European communicable disease bulletin*. 2013; **18**.
- 59 ENVIN-UCI. *Estudio nacional de vigilancia de infección nosocomial en servicios de medicina intensiva*. SOCIEDAD ESPAÑOLA DE MEDICINA INTENSIVA. CRÍTICA Y UNIDADES CORONARIAS (SEMICYUC). GRUPO DE TRABAJO DE ENFERMEDADES INFECCIOSAS. 2013. <http://hws.vhebron.net/envin-helics/Help/Informe%20ENVIN-UCI%202013.pdf>
- 60 Maksymiuk AW, Thongprasert S, Hopfer R, Luna M, Fainstein V, Bodey GP. Systemic candidiasis in cancer patients. *Am J Med*. 1984; **77**: 20-27.
- 61 Pahissa A. Infección fúngica invasora producida por candida spp. Y otras levaduras. In: Entheos SLU, ed. *La infección fúngica invasora*. San Sebastian de los Reyes (Madrid): Grupo editorial Entheos, S.L.U. 2010; 125-160.
- 62 Cervera C. [candidemia and invasive candidiasis in the adult: Clinical forms and treatment]. *Enfermedades infecciosas y microbiología clínica*. 2012; **30**: 483-491.
- 63 Fernandez-Cruz A, Cruz Menarguez M, Munoz P, et al. The search for endocarditis in patients with candidemia: A systematic recommendation for echocardiography? A prospective cohort. *European journal of clinical microbiology & infectious diseases : official publication of the European Society of Clinical Microbiology*. 2015.
- 64 Colomba C, Trizzino M, Imburgia C, Madonia S, Siracusa L, Giammanco GM. Candida glabrata meningitis and endocarditis: A late severe complication of candidemia. *International journal of infectious diseases : IJID : official publication of the International Society for Infectious Diseases*. 2014; **29**: 174-175.
- 65 Shah CP, McKey J, Spirn MJ, Maguire J. Ocular candidiasis: A review. *The British journal of ophthalmology*. 2008; **92**: 466-468.
- 66 Rammaert B, Desjardins A, Lortholary O. New insights into hepatosplenic candidosis, a manifestation of chronic disseminated candidosis. *Mycoses*. 2012; **55**: e74-84.
- 67 Clancy CJ, Nguyen MH. Undiagnosed invasive candidiasis: Incorporating non-culture diagnostics into rational prophylactic and preemptive antifungal strategies. *Expert review of anti-infective therapy*. 2014; **12**: 731-734.
- 68 Kauffman CA, Fisher JF, Sobel JD, Newman CA. Candida urinary tract infections--diagnosis. *Clin Infect Dis*. 2011; **52 Suppl 6**: S452-456.
- 69 Corrales I, Gimenez E, Aguilar G, et al. Detection of fungal DNA in peritoneal fluids by a pcr DNA low-density microarray system and quantitation of serum (1-3)-beta-d-glucan in the diagnosis of peritoneal candidiasis. *Medical mycology : official publication of the International Society for Human and Animal Mycology*. 2015; **53**: 199-204.

- 70 Montravers P, Dupont H, Eggimann P. Intra-abdominal candidiasis: The guidelines-forgotten non-candidemic invasive candidiasis. *Intensive care medicine*. 2013; **39**: 2226-2230.
- 71 Puig-Asensio M, Padilla B, Garnacho-Montero J, et al. Epidemiology and predictive factors for early and late mortality in candida bloodstream infections: A population-based surveillance in Spain. *Clin Microbiol Infect*. 2014; **20**: O245-254.
- 72 Pfaller MA, Diekema DJ. Epidemiology of invasive candidiasis: A persistent public health problem. *Clin Microbiol Rev*. 2007; **20**: 133-163.
- 73 Guinea J. Global trends in the distribution of candida species causing candidemia. *Clin Microbiol Infect*. 2014; **20 Suppl 6**: 5-10.
- 74 Guinea J, Zaragoza O, Escribano P, et al. Molecular identification and antifungal susceptibility of yeast isolates causing fungemia collected in a population-based study in Spain in 2010 and 2011. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2014; **58**: 1529-1537.
- 75 Colombo AL, Nucci M, Park BJ, et al. Epidemiology of candidemia in Brazil: A nationwide sentinel surveillance of candidemia in eleven medical centers. *Journal of clinical microbiology*. 2006; **44**: 2816-2823.
- 76 Tan BH, Chakrabarti A, Li RY, et al. Incidence and species distribution of candidaemia in Asia: A laboratory-based surveillance study. *Clin Microbiol Infect*. 2015.
- 77 Berdal JE, Haagenes R, Ranheim T, Bjørnholm JV. Nosocomial candidemia; risk factors and prognosis revisited; 11 years experience from a Norwegian secondary hospital. *PLoS One*. 2014; **9**: e103916.
- 78 Arendrup MC, Bruun B, Christensen JJ, et al. National surveillance of fungemia in Denmark (2004 to 2009). *Journal of clinical microbiology*. 2011; **49**: 325-334.
- 79 Asmundsdóttir LR, Erlendsdóttir H, Gottfredsson M. Nationwide study of candidemia, antifungal use, and antifungal drug resistance in Iceland, 2000 to 2011. *Journal of clinical microbiology*. 2013; **51**: 841-848.
- 80 Rodríguez-Tudela JL, Alastruéy-Izquierdo A, Gago S, et al. Burden of serious fungal infections in Spain. *Clin Microbiol Infect*. 2015; **21**: 183-189.
- 81 Neofytos D, Lu K, Hatfield-Seung A, et al. Epidemiology, outcomes, and risk factors of invasive fungal infections in adult patients with acute myelogenous leukemia after induction chemotherapy. *Diagnostic microbiology and infectious disease*. 2013; **75**: 144-149.
- 82 Laupland KB, Gregson DB, Church DL, Ross T, Elsayed S. Invasive candida species infections: A 5 year population-based assessment. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*. 2005; **56**: 532-537.
- 83 Nucci M, Queiroz-Telles F, Alvarado-Matute T, et al. Epidemiology of candidemia in Latin America: A laboratory-based survey. *PLoS One*. 2013; **8**: e59373.
- 84 Corzo-Leon DE, Alvarado-Matute T, Colombo AL, et al. Surveillance of candida spp bloodstream infections: Epidemiological trends and risk factors of death in two Mexican tertiary care hospitals. *PLoS One*. 2014; **9**: e97325.
- 85 Hesstvedt L, Gaustad P, Andersen CT, et al. Twenty-two years of candidemia surveillance - results from a Norwegian national study. *Clin Microbiol Infect*. 2015.
- 86 Chen S, Slavin M, Nguyen Q, et al. Active surveillance for candidemia, Australia. *Emerg Infect Dis*. 2006; **12**: 1508-1516.
- 87 Yang ZT, Wu L, Liu XY, et al. Epidemiology, species distribution and outcome of nosocomial candida spp. Bloodstream infection in Shanghai. *BMC Infect Dis*. 2014; **14**: 241.

- 
- 88 Kreusch A, Karstaedt AS. Candidemia among adults in soweto, south africa, 1990-2007. *International journal of infectious diseases : IJID : official publication of the International Society for Infectious Diseases*. 2013; **17**: e621-623.
- 89 Pappas PG, Kauffman CA, Andes D, et al. Clinical practice guidelines for the management of candidiasis: 2009 update by the infectious diseases society of america. *Clin Infect Dis*. 2009; **48**: 503-535.
- 90 Rodriguez-Hernandez MJ, Ruiz-Perez de Pipaon M, Marquez-Solero M, et al. [candidemias: Multicentre analysis in 16 hospitals in andalusia (spain)]. *Enfermedades infecciosas y microbiologia clinica*. 2011; **29**: 328-333.
- 91 Aguado JM, Ruiz-Camps I, Munoz P, et al. [guidelines for the treatment of invasive candidiasis and other yeasts. Spanish society of infectious diseases and clinical microbiology (seimc). 2010 update]. *Enfermedades infecciosas y microbiologia clinica*. 2011; **29**: 345-361.
- 92 Peman J, Zaragoza R. Combined use of nonculture-based lab techniques in the diagnosis and management of critically ill patients with invasive fungal infections. *Expert review of anti-infective therapy*. 2012; **10**: 1321-1330.
- 93 Pfaller MA, Messer SA, Moet GJ, Jones RN, Castanheira M. Candida bloodstream infections: Comparison of species distribution and resistance to echinocandin and azole antifungal agents in intensive care unit (icu) and non-icu settings in the sentry antimicrobial surveillance program (2008-2009). *International journal of antimicrobial agents*. 2011; **38**: 65-69.
- 94 Bassetti M, Merelli M, Righi E, et al. Epidemiology, species distribution, antifungal susceptibility, and outcome of candidemia across five sites in italy and spain. *Journal of clinical microbiology*. 2013; **51**: 4167-4172.
- 95 Bergamasco MD, Garnica M, Colombo AL, Nucci M. Epidemiology of candidemia in patients with hematologic malignancies and solid tumours in brazil. *Mycoses*. 2012; **May 56**: 256-263.
- 96 Pagano L, Akova M, Dimopoulos G, Herbrecht R, Drgona L, Blijlevens N. Risk assessment and prognostic factors for mould-related diseases in immunocompromised patients. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*. 2011; **66 Suppl 1**: i5-14.
- 97 Leon C, Ostrosky-Zeichner L, Schuster M. What's new in the clinical and diagnostic management of invasive candidiasis in critically ill patients. *Intensive care medicine*. 2014; **40**: 808-819.
- 98 Pasqualotto AC, Rosa DD, Medeiros LR, Severo LC. Candidaemia and cancer: Patients are not all the same. *BMC Infect Dis*. 2006; **6**: 50.
- 99 Odabasi Z, Mattiuzzi G, Estey E, et al. Beta-d-glucan as a diagnostic adjunct for invasive fungal infections: Validation, cutoff development, and performance in patients with acute myelogenous leukemia and myelodysplastic syndrome. *Clin Infect Dis*. 2004; **39**: 199-205.
- 100 Ullmann AJ, Akova M, Herbrecht R, et al. Escmid\* guideline for the diagnosis and management of candida diseases 2012: Adults with haematological malignancies and after haematopoietic stem cell transplantation (hct). *Clin Microbiol Infect*. 2012; **18 Suppl 7**: 53-67.
- 101 Nucci M, Garnica M, Gloria AB, et al. Invasive fungal diseases in haematopoietic cell transplant recipients and in patients with acute myeloid leukaemia or myelodysplasia in brazil. *Clin Microbiol Infect*. 2012.

- 
- 102 Slavin MA, Sorrell TC, Marriott D, et al. Candidaemia in adult cancer patients: Risks for fluconazole-resistant isolates and death. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*. 2010; **65**: 1042-1051.
- 103 Florescu DF, Sandkovsky U. Fungal infections in intestinal and multivisceral transplant recipients. *Curr Opin Organ Transplant*. 2015; **20**: 295-302.
- 104 Pappas PG, Alexander BD, Andes DR, et al. Invasive fungal infections among organ transplant recipients: Results of the transplant-associated infection surveillance network (transnet). *Clin Infect Dis*. 2010; **50**: 1101-1111.
- 105 Sganga G, Bianco G, Frongillo F, Lirosi MC, Nure E, Agnes S. Fungal infections after liver transplantation: Incidence and outcome. *Transplantation proceedings*. 2014; **46**: 2314-2318.
- 106 Chakrabarti A, Sood P, Rudramurthy SM, et al. Incidence, characteristics and outcome of icu-acquired candidemia in india. *Intensive care medicine*. 2015; **41**: 285-295.
- 107 Bassetti M, Marchetti M, Chakrabarti A, et al. A research agenda on the management of intra-abdominal candidiasis: Results from a consensus of multinational experts. *Intensive care medicine*. 2013; **39**: 2092-2106.
- 108 Fochtmann A, Forstner C, Hagmann M, et al. Predisposing factors for candidemia in patients with major burns. *Burns : journal of the International Society for Burn Injuries*. 2015; **41**: 326-332.
- 109 Guimaraes T, Nucci M, Mendonca JS, et al. Epidemiology and predictors of a poor outcome in elderly patients with candidemia. *International journal of infectious diseases : IJID : official publication of the International Society for Infectious Diseases*. 2012; **16**: e442-447.
- 110 Bassetti M, Molinari MP, Mussap M, Viscoli C, Righi E. Candidaemia in internal medicine departments: The burden of a rising problem. *Clin Microbiol Infect*. 2013; **19**: E281-284.
- 111 De Rosa FG, Corcione S, Filippini C, et al. The effect on mortality of fluconazole or echinocandins treatment in internal medicine wards. *PLoS One*. 2015; **10**: e0125149.
- 112 Falcone M, Concia E, Iori I, et al. Identification and management of invasive mycoses in internal medicine: A road-map for physicians. *Internal and emergency medicine*. 2014; **9**: 501-511.
- 113 Silveira FP, Kusne S, Practice ASTIDCo. Candida infections in solid organ transplantation. *American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons*. 2013; **13 Suppl 4**: 220-227.
- 114 Cornely OA, Bassetti M, Calandra T, et al. Escmid\* guideline for the diagnosis and management of candida diseases 2012: Non-neutropenic adult patients. *Clin Microbiol Infect*. 2012; **18 Suppl 7**: 19-37.
- 115 Martin Lesende I, Gorrionogitia Iturbe A, Gomez Pavon J, Baztan Cortes JJ, Abizanda Soler P. [the frail elderly. Detection and management in primary care]. *Atencion primaria / Sociedad Espanola de Medicina de Familia y Comunitaria*. 2010; **42**: 388-393.
- 116 Nieto MC, Telleria O, Cisterna R. Sentinel surveillance of invasive candidiasis in spain: Epidemiology and antifungal susceptibility. *Diagnostic microbiology and infectious disease*. 2015; **81**: 34-40.
- 117 Lockhart SR, Iqbal N, Cleveland AA, et al. Species identification and antifungal susceptibility testing of candida bloodstream isolates from population-based

- surveillance studies in two u.s. Cities from 2008 to 2011. *Journal of clinical microbiology*. 2012; **50**: 3435-3442.
- 118 Caggiano G, Coretti C, Bartolomeo N, Lovero G, De Giglio O, Montagna MT. Candida bloodstream infections in Italy: Changing epidemiology during 16 years of surveillance. *BioMed research international*. 2015; **2015**: 256580.
- 119 Haider S, Rotstein C, Horn D, Laverdiere M, Azie N. The prospective antifungal therapy alliance((r)) registry: A two-centre Canadian experience. *The Canadian journal of infectious diseases & medical microbiology = Journal canadien des maladies infectieuses et de la microbiologie medicale / AMMI Canada*. 2014; **25**: 17-23.
- 120 Jung SI, Shin JH, Song JH, et al. Multicenter surveillance of species distribution and antifungal susceptibilities of candida bloodstream isolates in South Korea. *Medical mycology : official publication of the International Society for Human and Animal Mycology*. 2010; **48**: 669-674.
- 121 Mikulska M, Bassetti M, Ratto S, Viscoli C. Invasive candidiasis in non-hematological patients. *Mediterr J Hematol Infect Dis*. 2011; **3**: e2011007.
- 122 Arendrup MC, Perlin DS. Echinocandin resistance: An emerging clinical problem? *Current opinion in infectious diseases*. 2014; **27**: 484-492.
- 123 Miyazaki T, Kohno S. Current recommendations and importance of antifungal stewardship for the management of invasive candidiasis. *Expert review of anti-infective therapy*. 2015: 1-13.
- 124 Arendrup MC, Dzajic E, Jensen RH, et al. Epidemiological changes with potential implication for antifungal prescription recommendations for fungaemia: Data from a nationwide fungaemia surveillance programme. *Clin Microbiol Infect*. 2013; **19**: E343-353.
- 125 Pfaller MA, Messer SA, Woosley LN, Jones RN, Castanheira M. Echinocandin and triazole antifungal susceptibility profiles for clinical opportunistic yeast and mold isolates collected from 2010 to 2011: Application of new CLSI clinical breakpoints and epidemiological cutoff values for characterization of geographic and temporal trends of antifungal resistance. *Journal of clinical microbiology*. 2013; **51**: 2571-2581.
- 126 Won EJ, Shin JH, Choi MJ, et al. Antifungal susceptibilities of bloodstream isolates of candida species from nine hospitals in Korea: Application of new antifungal breakpoints and relationship to antifungal usage. *PLoS One*. 2015; **10**: e0118770.
- 127 Marcos-Zambrano LJ, Escribano P, Sanchez C, Munoz P, Bouza E, Guinea J. Antifungal resistance to fluconazole and echinocandins is not emerging in yeast isolates causing fungemia in a Spanish tertiary care center. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2014; **58**: 4565-4572.
- 128 Alexander BD, Johnson MD, Pfeiffer CD, et al. Increasing echinocandin resistance in candida glabrata: Clinical failure correlates with presence of fks mutations and elevated minimum inhibitory concentrations. *Clin Infect Dis*. 2013; **56**: 1724-1732.
- 129 Figueras C, Diaz de Heredia C, Garcia JJ, et al. [the Spanish society of paediatric infectious diseases (seip) recommendations on the diagnosis and management of invasive candidiasis]. *An Pediatr (Barc)*. 2011; **74**: 337 e331-337 e317.
- 130 Sanchez Garcia M. [clinical spectrum of invasive candidiasis in critically ill non-neutropenic patients]. *Revista iberoamericana de micologia*. 2006; **23**: 8-11.
- 131 Lam SW, Eschenauer GA, Carver PL. Evolving role of early antifungals in the adult intensive care unit. *Critical care medicine*. 2009; **37**: 1580-1593.

- 132 Garnacho-Montero J, Diaz-Martin A, Ruiz-Perez De Piappon M, Garcia-Cabrera E. [invasive fungal infection in critically ill patients]. *Enfermedades infecciosas y microbiología clínica*. 2012; **30**: 338-343.
- 133 Muskett H, Shahin J, Eyres G, Harvey S, Rowan K, Harrison D. Risk factors for invasive fungal disease in critically ill adult patients: A systematic review. *Critical care*. 2011; **15**: R287.
- 134 Timsit JF, Chemam S, Bailly S. Empiric/pre-emptive anti-candida therapy in non-neutropenic icu patients. *F1000prime reports*. 2015; **7**: 21.
- 135 Ahmed A, Azim A, Baronia AK, Marak KR, Gurjar M. Risk prediction for invasive candidiasis. *Indian journal of critical care medicine : peer-reviewed, official publication of Indian Society of Critical Care Medicine*. 2014; **18**: 682-688.
- 136 Pittet D, Monod M, Suter PM, Frenk E, Auckenthaler R. Candida colonization and subsequent infections in critically ill surgical patients. *Ann Surg*. 1994; **220**: 751-758.
- 137 Michalopoulos AS, Geroulanos S, Mentzelopoulos SD. Determinants of candidemia and candidemia-related death in cardiothoracic icu patients. *Chest*. 2003; **124**: 2244-2255.
- 138 Paphitou NI, Ostrosky-Zeichner L, Rex JH. Rules for identifying patients at increased risk for candidal infections in the surgical intensive care unit: Approach to developing practical criteria for systematic use in antifungal prophylaxis trials. *Medical mycology : official publication of the International Society for Human and Animal Mycology*. 2005; **43**: 235-243.
- 139 Ostrosky-Zeichner L, Sable C, Sobel J, et al. Multicenter retrospective development and validation of a clinical prediction rule for nosocomial invasive candidiasis in the intensive care setting. *European journal of clinical microbiology & infectious diseases : official publication of the European Society of Clinical Microbiology*. 2007; **26**: 271-276.
- 140 Shorr AF, Tabak YP, Johannes RS, Sun X, Spalding J, Kollef MH. Candidemia on presentation to the hospital: Development and validation of a risk "score". *Critical care*. 2009; **13**: R156.
- 141 Leon C, Ruiz-Santana S, Saavedra P, et al. Usefulness of the "candida "score"" for discriminating between candida colonization and invasive candidiasis in non-neutropenic critically ill patients: A prospective multicenter study. *Critical care medicine*. 2009; **37**: 1624-1633.
- 142 Dupont H, Bourichon A, Paugam-Burtz C, Mantz J, Desmonts JM. Can yeast isolation in peritoneal fluid be predicted in intensive care unit patients with peritonitis? *Critical care medicine*. 2003; **31**: 752-757.
- 143 Leon C, Ruiz-Santana S, Saavedra P, et al. A bedside scoring system ("candida "score") for early antifungal treatment in nonneutropenic critically ill patients with candida colonization. *Critical care medicine*. 2006; **34**: 730-737.
- 144 Ostrosky-Zeichner L, Pappas PG, Shoham S, et al. Improvement of a clinical prediction rule for clinical trials on prophylaxis for invasive candidiasis in the intensive care unit. *Mycoses*. 2011; **54**: 46-51.
- 145 Eggimann P, Que YA, Revelly JP, Pagani JL. Preventing invasive candida infections. Where could we do better? *The Journal of hospital infection*. 2015; **89**: 302-308.
- 146 Azoulay E, Dupont H, Tabah A, et al. Systemic antifungal therapy in critically ill patients without invasive fungal infection\*. *Critical care medicine*. 2012; **40**: 813-822.
- 147 Lewis RE. Current concepts in antifungal pharmacology. *Mayo Clinic proceedings*. 2011; **86**: 805-817.
- 148 Catalan M, Montejo JC. [systemic antifungals. Pharmacodynamics and pharmacokinetics]. *Revista iberoamericana de micología*. 2006; **23**: 39-49.



- 149 Niwa T, Imagawa Y, Yamazaki H. Drug interactions between nine antifungal agents and drugs metabolized by human cytochromes p450. *Current drug metabolism*. 2014; **15**: 651-679.
- 150 Chau MM, Kong DC, van Hal SJ, et al. Consensus guidelines for optimising antifungal drug delivery and monitoring to avoid toxicity and improve outcomes in patients with haematological malignancy, 2014. *Internal medicine journal*. 2014; **44**: 1364-1388.
- 151 Rani N, Sharma A, Gupta GK, Singh R. Imidazoles as potential antifungal agents: A review. *Mini reviews in medicinal chemistry*. 2013; **13**: 1626-1655.
- 152 Scodavolpe S, Quaranta S, Lacarelle B, Solas C. [triazole antifungal agents: Practice guidelines of therapeutic drug monitoring and perspectives in treatment optimization]. *Annales de biologie clinique*. 2014; **72**: 391-404.
- 153 Ferrer R, Gómez-Cámara A, Jarque I, Quindos G, Tejerina T. Estudio comparativo multidisciplinar de las equinocandinas, anidulafungina, caspofungina y micafungina. *Actualidad en Farmacología Terapéutica*. 2013; **11**: 146-159.
- 154 Zaragoza R, Peman J, Salavert M, et al. Multidisciplinary approach to the treatment of invasive fungal infections in adult patients. Prophylaxis, empirical, preemptive or targeted therapy, which is the best in the different hosts? *Therapeutics and clinical risk management*. 2008; **4**: 1261-1280.
- 155 Morrissey CO, Gilroy NM, Macesis N, et al. Consensus guidelines for the use of empiric and diagnostic-driven antifungal treatment strategies in haematological malignancy, 2014. *Internal medicine journal*. 2014; **44**: 1298-1314.
- 156 Massanet P, Jung B, Molinari N, et al. [antifungal treatment for suspected or proved candidiasis in the critically ill]. *Annales francaises d'anesthesie et de reanimation*. 2014; **33**: 232-239.
- 157 Valerio M, Vena A, Bouza E, et al. How much european prescribing physicians know about invasive fungal infections management? *BMC Infect Dis*. 2015; **15**: 80.
- 158 Arnold HM, Micek ST, Shorr AF, et al. Hospital resource utilization and costs of inappropriate treatment of candidemia. *Pharmacotherapy*. 2010; **30**: 361-368.
- 159 Aitken SL, Beyda ND, Shah DN, et al. Clinical practice patterns in hospitalized patients at risk for invasive candidiasis: Role of antifungal stewardship programs in an era of rapid diagnostics. *The Annals of pharmacotherapy*. 2014; **48**: 683-690.
- 160 Zilberberg MD, Kollef MH, Arnold H, et al. Inappropriate empiric antifungal therapy for candidemia in the icu and hospital resource utilization: A retrospective cohort study. *BMC Infect Dis*. 2010; **10**: 150.
- 161 Reed EE, West JE, Keating EA, et al. Improving the management of candidemia through antimicrobial stewardship interventions. *Diagnostic microbiology and infectious disease*. 2014; **78**: 157-161.
- 162 Caspofungina-AEMPS. *Ficha técnica de la caspofungina*. 2011. [http://www.ema.europa.eu/docs/es\\_ES/document\\_library/EPAR\\_-\\_Product\\_Information/human/000379/WC500021033.pdf](http://www.ema.europa.eu/docs/es_ES/document_library/EPAR_-_Product_Information/human/000379/WC500021033.pdf)
- 163 Anidulafungina-AEMPS. *Ficha técnica de la anidulafungina*. 2012. [http://www.ema.europa.eu/docs/es\\_ES/document\\_library/EPAR\\_-\\_Product\\_Information/human/000788/WC500020673.pdf](http://www.ema.europa.eu/docs/es_ES/document_library/EPAR_-_Product_Information/human/000788/WC500020673.pdf)
- 164 Micafungina-AEMPS. *Ficha técnica de la micafungina*. [http://www.ema.europa.eu/docs/es\\_ES/document\\_library/EPAR\\_-\\_Product\\_Information/human/000734/WC500031075.pdf](http://www.ema.europa.eu/docs/es_ES/document_library/EPAR_-_Product_Information/human/000734/WC500031075.pdf)
- 165 Anfotericina-AEMPS. *Ficha técnica de anfotericina b (complejo lipídico)*. [http://www.aemps.gob.es/cima/pdfs/es/ft/60945/FT\\_60945.pdf](http://www.aemps.gob.es/cima/pdfs/es/ft/60945/FT_60945.pdf)

- 166 Voriconazol-AEMPS. *Ficha técnica de voriconazol*.  
[http://www.ema.europa.eu/docs/es\\_ES/document\\_library/EPAR\\_-](http://www.ema.europa.eu/docs/es_ES/document_library/EPAR_-_Product_Information/human/000387/WC500049756.pdf)  
\_Product\_Information/human/000387/WC500049756.pdf
- 167 Fluconazol-AEMPS. *Ficha técnica del fluconazol*.
- 168 COMIC, (COMIC) GdCeM, Antibióticos CdlyPd. Recomendaciones sobre el manejo de infecciones fúngicas invasoras (ifis): Guía del hospital general universitario gregorio marañón. 2014.
- 169 Peman J, Canton E, Quindos G, et al. Epidemiology, species distribution and in vitro antifungal susceptibility of fungaemia in a spanish multicentre prospective survey. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*. 2012; **67**: 1181-1187.
- 170 Shields RK, Nguyen MH, Press EG, et al. The presence of an fks mutation rather than mic is an independent risk factor for failure of echinocandin therapy among patients with invasive candidiasis due to candida glabrata. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2012; **56**: 4862-4869.
- 171 Saraya T, Tanabe K, Araki K, et al. Breakthrough invasive candida glabrata in patients on micafungin: A novel fks gene conversion correlated with sequential elevation of mic. *Journal of clinical microbiology*. 2014; **52**: 2709-2712.
- 172 Bizerra FC, Jimenez-Ortigosa C, Souza AC, et al. Breakthrough candidemia due to multidrug-resistant candida glabrata during prophylaxis with a low dose of micafungin. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2014; **58**: 2438-2440.
- 173 Deorukhkar SC, Saini S, Mathew S. Non-albicans candida infection: An emerging threat. *Interdisciplinary perspectives on infectious diseases*. 2014; **2014**: 615958.
- 174 Forrest GN, Weekes E, Johnson JK. Increasing incidence of candida parapsilosis candidemia with caspofungin usage. *The Journal of infection*. 2008; **56**: 126-129.
- 175 Pfaller MA, Castanheira M, Lockhart SR, Ahlquist AM, Messer SA, Jones RN. Frequency of decreased susceptibility and resistance to echinocandins among fluconazole-resistant bloodstream isolates of candida glabrata. *Journal of clinical microbiology*. 2012; **50**: 1199-1203.
- 176 Mondain V, Lieutier F, Hasseine L, et al. A 6-year antifungal stewardship programme in a teaching hospital. *Infection*. 2013; **41**: 621-628.
- 177 Raymond S, Henon T, Grenouillet F, et al. [clinical audit on the use of expensive systemic antifungals in the besancon university hospital]. *Medecine et maladies infectieuses*. 2009; **39**: 125-132.
- 178 Grau-Cerrato S, Ferrandez-Quirante O. [pharmacoeconomics of therapy in invasive candidiasis]. *Revista iberoamericana de micología*. 2009; **26**: 90-93.
- 179 Rentz AM, Halpern MT, Bowden R. The impact of candidemia on length of hospital stay, outcome, and overall cost of illness. *Clin Infect Dis*. 1998; **27**: 781-788.
- 180 Falagas ME, Apostolou KE, Pappas VD. Attributable mortality of candidemia: A systematic review of matched cohort and case-control studies. *European journal of clinical microbiology & infectious diseases : official publication of the European Society of Clinical Microbiology*. 2006; **25**: 419-425.
- 181 Guery BP, Arendrup MC, Auzinger G, et al. Management of invasive candidiasis and candidemia in adult non-neutropenic intensive care unit patients: Part i. Epidemiology and diagnosis. *Intensive care medicine*. 2009; **35**: 55-62.
- 182 Hennen CR. Pharmacoeconomic evaluations of antifungal therapies. *Curr Med Res Opin*. 2009; **25**: 1751-1758.



- 183 Reboli AC, Rotstein C, Kett DH, et al. Resource utilization and cost of treatment with anidulafungin or fluconazole for candidaemia and other forms of invasive candidiasis: Focus on critically ill patients. *Pharmacoeconomics*. 2011; **29**: 705-717.
- 184 Garcia-Vargas M, Casado MA, Mir N, Barrueta JA. [cost analysis of 3 candins in the treatment of invasive candidiasis in adult non-neutropaenic patients in Spain]. *Farm Hosp*. 2012; **36**: 207-215.
- 185 Ashley ED, Drew R, Johnson M, et al. Cost of invasive fungal infections in the era of new diagnostics and expanded treatment options. *Pharmacotherapy*. 2012.
- 186 Biomarkers Definitions Working G. Biomarkers and surrogate endpoints: Preferred definitions and conceptual framework. *Clinical pharmacology and therapeutics*. 2001; **69**: 89-95.
- 187 Ortega F. Estrategias analíticas en la investigación de nuevos biomarcadores. *Monografías de la Real Academia Nacional de Farmacia*. 2010; **XXX**: 13-54.
- 188 Pitarch A, Gil C, Nombela C. La inmunoproteómica en el descubrimiento de biomarcadores de tercera generación. El ejemplo de las candidiasis invasivas. *Monografías de la Real Academia Nacional de Farmacia*. 2010; **XXX**: 55-83.
- 189 Pontón J, García ME, López Medrano R. Diagnóstico serológico de las micosis. *Guía Práctica de Identificación y Diagnóstico en Micología Clínica*. 2007; **14**: 17-30.
- 190 Delgado-Silva Y, Vaz C, Carvalho-Pereira J, et al. Participation of candida albicans transcription factor rlm1 in cell wall biogenesis and virulence. *PLoS One*. 2014; **9**: e86270.
- 191 Card RM, Warburton PJ, MacLaren N, Mullany P, Allan E, Anjum MF. Application of microarray and functional-based screening methods for the detection of antimicrobial resistance genes in the microbiomes of healthy humans. *PLoS One*. 2014; **9**: e86428.
- 192 Pitarch A, Nombela C, Gil C. Serum antibody signature directed against candida albicans hsp90 and enolase detects invasive candidiasis in non-neutropenic patients. *Journal of proteome research*. 2014; **13**: 5165-5184.
- 193 Cuenca-Estrella M, Verweij PE, Arendrup MC, et al. Escmid\* guideline for the diagnosis and management of candida diseases 2012: Diagnostic procedures. *Clin Microbiol Infect*. 2012; **18 Suppl 7**: 9-18.
- 194 De Pauw B, Walsh TJ, Donnelly JP, et al. Revised definitions of invasive fungal disease from the european organization for research and treatment of cancer/invasive fungal infections cooperative group and the national institute of allergy and infectious diseases mycoses study group (eortc/msg) consensus group. *Clin Infect Dis*. 2008; **46**: 1813-1821.
- 195 Ponton J. [usefulness of biological markers in the diagnosis of invasive candidiasis]. *Revista iberoamericana de micología*. 2009; **26**: 8-14.
- 196 Rose SR, Vallabhajosyula S, Velez MG, et al. The utility of bronchoalveolar lavage beta-d-glucan testing for the diagnosis of invasive fungal infections. *The Journal of infection*. 2014; **69**: 278-283.
- 197 Hoenigl M, Prattes J, Spiess B, et al. Performance of galactomannan, beta-d-glucan, aspergillus lateral-flow device, conventional culture, and pcr tests with bronchoalveolar lavage fluid for diagnosis of invasive pulmonary aspergillosis. *Journal of clinical microbiology*. 2014; **52**: 2039-2045.
- 198 Litvintseva AP, Lindsley MD, Gade L, et al. Utility of (1-3)-beta-d-glucan testing for diagnostics and monitoring response to treatment during the multistate outbreak of fungal meningitis and other infections. *Clin Infect Dis*. 2014; **58**: 622-630.

- 199 Malani AN, Singal B, Wheat LJ, et al. (1,3)-beta-d-glucan in cerebrospinal fluid for diagnosis of fungal meningitis associated with contaminated methylprednisolone injections. *Journal of clinical microbiology*. 2015; **53**: 799-803.
- 200 Rhein J, Bahr NC, Morawski BM, et al. Detection of high cerebrospinal fluid levels of (1->3)-beta-d-glucan in cryptococcal meningitis. *Open forum infectious diseases*. 2014; **1**: ofu105.
- 201 Tissot F, Lamoth F, Hauser PM, et al. Beta-glucan antigenemia anticipates diagnosis of blood culture-negative intraabdominal candidiasis. *Am J Respir Crit Care Med*. 2013; **188**: 1100-1109.
- 202 Posteraro B, De Pascale G, Tumbarello M, et al. Early diagnosis of candidemia in intensive care unit patients with sepsis: A prospective comparison of (1->3)-beta-d-glucan assay, candida "score", and colonization index. *Critical care*. 2011; **15**: R249.
- 203 Mikulska M, Furfaro E, Viscoli C. Non-cultural methods for the diagnosis of invasive fungal disease. *Expert review of anti-infective therapy*. 2014; **13**: 1-15.
- 204 Lamoth F, Cruciani M, Mengoli C, et al. Beta-glucan antigenemia assay for the diagnosis of invasive fungal infections in patients with hematological malignancies: A systematic review and meta-analysis of cohort studies from the third european conference on infections in leukemia (ecil-3). *Clin Infect Dis*. 2012; **54**: 633-643.
- 205 Mutschlechner W, Risslegger B, Willinger B, et al. Bronchoalveolar lavage fluid (1,3)beta-d-glucan for the diagnosis of invasive fungal infections in solid organ transplantation: A prospective multicenter study. *Transplantation*. 2015.
- 206 Persat F, Ranque S, Derouin F, Michel-Nguyen A, Picot S, Sulahian A. Contribution of the (1->3)-beta-d-glucan assay for diagnosis of invasive fungal infections. *Journal of clinical microbiology*. 2008; **46**: 1009-1013.
- 207 Mohr JF, Sims C, Paetznick V, et al. Prospective survey of (1->3)-beta-d-glucan and its relationship to invasive candidiasis in the surgical intensive care unit setting. *Journal of clinical microbiology*. 2011; **49**: 58-61.
- 208 Delaloye J, Calandra T. Invasive candidiasis as a cause of sepsis in the critically ill patient. *Virulence*. 2014; **5**: 161-169.
- 209 Theel ES, Doern CD. Beta-d-glucan testing is important for diagnosis of invasive fungal infections. *Journal of clinical microbiology*. 2013; **51**: 3478-3483.
- 210 Ayats J, Martin-Mazuelos E, Peman J, et al. [spanish society of clinical microbiology and infectious diseases (seimc) guidelines for the diagnosis of invasive fungal infections. 2010 update]. *Enfermedades infecciosas y microbiología clínica*. 2011; **29**: 39 e31-15.
- 211 Lain A, Elguezabal N, Moragues MD, Garcia-Ruiz JC, del Palacio A, Ponton J. Contribution of serum biomarkers to the diagnosis of invasive candidiasis. *Expert Rev Mol Diagn*. 2008; **8**: 315-325.
- 212 Koo S, Bryar JM, Page JH, Baden LR, Marty FM. Diagnostic performance of the (1->3)-beta-d-glucan assay for invasive fungal disease. *Clin Infect Dis*. 2009; **49**: 1650-1659.
- 213 Metan G, Koc AN, Agkus C, Kaynar LG, Alp E, Eser B. Can bacteraemia lead to false positive results in 1,3-beta-d-glucan test? Analysis of 83 bacteraemia episodes in high-risk patients for invasive fungal infections. *Revista iberoamericana de micología*. 2012; **29**: 169-171.
- 214 Racil Z, Kocmanova I, Lengerova M, et al. Difficulties in using 1,3-{beta}-d-glucan as the screening test for the early diagnosis of invasive fungal infections in patients with haematological malignancies--high frequency of false-positive results and their analysis. *Journal of medical microbiology*. 2010; **59**: 1016-1022.

- 215 Shupp JW, Petraitiene R, Jaskille AD, et al. Early serum (1-->3)-beta-d-glucan levels in patients with burn injury. *Mycoses*. 2012; **55**: 224-227.
- 216 Furfaro E, Mikulska M, Del Bono V, et al. Bloodstream infections are an improbable cause of positive serum (1,3)-beta-d-glucan in hematology patients. *Clinical and vaccine immunology : CVI*. 2014; **21**: 1357-1359.
- 217 Desjardins A, Parize P, Angebault C, Lecuyer H, Lortholary O, Bougnoux ME. Lack of 1-3-b-d-glucan detection in adults with bacteraemia. *Medical mycology : official publication of the International Society for Human and Animal Mycology*. 2015; **53**: 405-408.
- 218 Lo Cascio G, Koncan R, Stringari G, et al. Interference of confounding factors on the use of (1,3)-beta-d-glucan in the diagnosis of invasive candidiasis in the intensive care unit. *European journal of clinical microbiology & infectious diseases : official publication of the European Society of Clinical Microbiology*. 2015; **34** 357-365.
- 219 Sulahian A, Porcher R, Bergeron A, et al. Use and limits of (1-3)-beta-d-glucan assay (fungitell(r)), compared to galactomannan determination (platelia aspergillus) for diagnosis of invasive aspergillosis. *Journal of clinical microbiology*. 2014: 2328-2333.
- 220 Furuya T, Toyama K. [usefulness of (1-->3)-beta-d-glucan measurement for diagnosis of deep mycosis]. *The Japanese journal of antibiotics*. 1993; **46**: 437-443.
- 221 Jaijakul S, Vazquez JA, Swanson RN, Ostrosky-Zeichner L. (1,3)-beta-d-glucan as a prognostic marker of treatment response in invasive candidiasis. *Clin Infect Dis*. 2012; **55**: 521-526.
- 222 Koo S, Baden LR, Marty FM. Post-diagnostic kinetics of the (1 --> 3)-beta-d-glucan assay in invasive aspergillosis, invasive candidiasis and pneumocystis jirovecii pneumonia. *Clin Microbiol Infect*. 2012; **18**: E122-127.
- 223 Garcia-Ruiz JC, del Carmen Arilla M, Regulez P, Quindos G, Alvarez A, Ponton J. Detection of antibodies to candida albicans germ tubes for diagnosis and therapeutic monitoring of invasive candidiasis in patients with hematologic malignancies. *Journal of clinical microbiology*. 1997; **35**: 3284-3287.
- 224 Peman J, Zaragoza R, Quindos G, et al. Clinical factors associated with a candida albicans germ tube antibody positive test in intensive care unit patients. *BMC Infect Dis*. 2011; **11**: 60.
- 225 Martinez-Jimenez MC, Munoz P, Guinea J, et al. Potential role of candida albicans germ tube antibody in the diagnosis of deep-seated candidemia. *Medical mycology*. 2014; **52**: 270-275.
- 226 Iruretagoyena JR, Regulez P, Quindos G, Ponton J. Antibodies to candida albicans germ tubes in two intensive care patients with invasive candidiasis. *Revista iberoamericana de micologia*. 2000; **17**: 93-96.
- 227 Alothman AF, Al-Musawi T, Al-Abdely HM, et al. Clinical practice guidelines for the management of invasive candida infections in adults in the middle east region: Expert panel recommendations. *Journal of infection and public health*. 2014; **7**: 6-19.
- 228 Zaragoza R, Peman J, Quindos G, et al. Clinical significance of the detection of candida albicans germ tube-specific antibodies in critically ill patients. *Clin Microbiol Infect*. 2009; **15**: 592-595.
- 229 Verduyn Lunel FM, Donnelly JP, van der Lee HA, Blijlevens NM, Verweij PE. Circulating candida-specific anti-mannan antibodies precede invasive candidiasis in patients undergoing myelo-ablative chemotherapy. *Clin Microbiol Infect*. 2009; **15**: 380-386.
- 230 Mikulska M, Calandra T, Sanguinetti M, Poulain D, Viscoli C. The use of mannan antigen and anti-mannan antibodies in the diagnosis of invasive candidiasis: Recommendations

- from the third european conference on infections in leukemia. *Critical care*. 2010; **14**: R222.
- 231 Ellis M, Al-Ramadi B, Bernsen R, Kristensen J, Alizadeh H, Hedstrom U. Prospective evaluation of mannan and anti-mannan antibodies for diagnosis of invasive candida infections in patients with neutropenic fever. *Journal of medical microbiology*. 2009; **58**: 606-615.
- 232 Held J, Kohlberger I, Rappold E, Busse Grawitz A, Hacker G. Comparison of (1->3)-beta-d-glucan, mannan/anti-mannan antibodies, and cand-tec candida antigen as serum biomarkers for candidemia. *Journal of clinical microbiology*. 2013; **51**: 1158-1164.
- 233 Morrissey CO. Advancing the field: Evidence for new management strategies in invasive fungal infections. *Current fungal infection reports*. 2013; **7**: 51-58.
- 234 Sendid B, Caillot D, Baccouch-Humbert B, et al. Contribution of the platelia candida-specific antibody and antigen tests to early diagnosis of systemic candida tropicalis infection in neutropenic adults. *Journal of clinical microbiology*. 2003; **41**: 4551-4558.
- 235 Chumpitazi BF, Lebeau B, Faure-Cognet O, et al. Characteristic and clinical relevance of candida mannan test in the diagnosis of probable invasive candidiasis. *Medical mycology : official publication of the International Society for Human and Animal Mycology*. 2014; **52**: 462-471.
- 236 Alam FF, Mustafa AS, Khan ZU. Comparative evaluation of (1, 3)-beta-d-glucan, mannan and anti-mannan antibodies, and candida species-specific snpcr in patients with candidemia. *BMC Infect Dis*. 2007; **7**: 103.
- 237 Nguyen MH, Wissel MC, Shields RK, et al. Performance of candida real-time polymerase chain reaction, beta-d-glucan assay, and blood cultures in the diagnosis of invasive candidiasis. *Clin Infect Dis*. 2012; **54**: 1240-1248.
- 238 Avni T, Leibovici L, Paul M. Pcr diagnosis of invasive candidiasis: Systematic review and meta-analysis. *Journal of clinical microbiology*. 2011; **49**: 665-670.
- 239 Abad A, Fernandez-Molina JV, Bikandi J, et al. What makes aspergillus fumigatus a successful pathogen? Genes and molecules involved in invasive aspergillosis. *Revista iberoamericana de micología*. 2010; **27**: 155-182.
- 240 Tsai HF, Sammons LR, Zhang X, et al. Microarray and molecular analyses of the azole resistance mechanism in candida glabrata oropharyngeal isolates. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2010; **54**: 3308-3317.
- 241 Domenech-Sanchez A, Vila J. [basis, types and application of DNA arrays in clinical microbiology]. *Enfermedades infecciosas y microbiología clinica*. 2004; **22**: 46-54.
- 242 Thomas DP, Pitarch A, Monteoliva L, Gil C, Lopez-Ribot JL. Proteomics to study candida albicans biology and pathogenicity. *Infect Disord Drug Targets*. 2006; **6**: 335-341.
- 243 Zohbi R, Wex B, Khalaf RA. Comparative proteomic analysis of a candida albicans dse1 mutant under filamentous and non-filamentous conditions. *Yeast*. 2014; **31**: 441-448.
- 244 Ardizzoni A, Posteraro B, Baschieri MC, et al. An antibody reactivity-based assay for diagnosis of invasive candidiasis using protein array. *International journal of immunopathology and pharmacology*. 2014; **27**: 403-412.
- 245 Rodriguez-Bano J, Pano-Pardo JR, Alvarez-Rocha L, et al. [programs for optimizing the use of antibiotics (proa) in spanish hospitals: Geih-seimc, sefh and sempsph consensus document]. *Enfermedades infecciosas y microbiología clinica*. 2012; **30**: 22 e21-22 e23.
- 246 Ruhnke M. Antifungal stewardship in invasive candida infections. *Clin Microbiol Infect*. 2014; **20 Suppl 6**: 11-18.
- 247 Puig-Asensio M, Peman J, Zaragoza R, et al. Impact of therapeutic strategies on the prognosis of candidemia in the icu. *Critical care medicine*. 2014.

- 248 Beyda ND, Alam MJ, Garey KW. Comparison of the t2dx instrument with t2candida assay and automated blood culture in the detection of candida species using seeded blood samples. *Diagnostic microbiology and infectious disease*. 2013; **77**: 324-326.
- 249 Huang AM, Newton D, Kunapuli A, et al. Impact of rapid organism identification via matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight combined with antimicrobial stewardship team intervention in adult patients with bacteremia and candidemia. *Clin Infect Dis*. 2013; **57**: 1237-1245.
- 250 Perez KK, Olsen RJ, Musick WL, et al. Integrating rapid pathogen identification and antimicrobial stewardship significantly decreases hospital costs. *Archives of pathology & laboratory medicine*. 2013; **137**: 1247-1254.
- 251 Forrest GN, Mankes K, Jabra-Rizk MA, et al. Peptide nucleic acid fluorescence in situ hybridization-based identification of candida albicans and its impact on mortality and antifungal therapy costs. *Journal of clinical microbiology*. 2006; **44**: 3381-3383.
- 252 Levesque E, El Anbassi S, Sitterle E, Foulet F, Merle JC, Botterel F. Contribution of (1,3)-beta-d-glucan to diagnosis of invasive candidiasis after liver transplantation. *Journal of clinical microbiology*. 2015; **53**: 771-776.
- 253 Martinez-Jimenez MCM, Patricia; Valerio, Maricela; Alonso, Roberto; Martos, Carmen; Guinea, Jesús and Bouza, Emilio. Potential role of candida biomarkers for discontinuation of unnecessary empirical therapy in patients with invasive candidiasis. *ICAAC 2013*. 2013; **Poster M 237**.
- 254 Cuenca-Estrella M. [laboratory diagnosis of fungal infection diseases]. *Enfermedades infecciosas y microbiología clínica*. 2012; **30**: 257-264.
- 255 Hanson KE, Pfeiffer CD, Lease ED, et al. Beta-d-glucan surveillance with preemptive anidulafungin for invasive candidiasis in intensive care unit patients: A randomized pilot study. *PLoS One*. 2012; **7**: e42282.
- 256 Martinez-Jimenez MC, Muñoz P, Valerio M, et al. Candida biomarkers in patients with candidemia and bacteremia *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2015; **x**: xxx.
- 257 Martinez-Jimenez MC, Munoz P, Valerio M, et al. Candida biomarkers in patients with candidaemia and bacteraemia. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*. 2015.
- 258 Lain A, Elguezaabal N, Brena S, et al. Diagnosis of invasive candidiasis by enzyme-linked immunosorbent assay using the n-terminal fragment of candida albicans hyphal wall protein 1. *BMC microbiology*. 2007; **7**: 35.
- 259 Brand A. Hyphal growth in human fungal pathogens and its role in virulence. *International journal of microbiology*. 2012; **2012**: 517529.
- 260 Saville SP, Lazzell AL, Monteagudo C, Lopez-Ribot JL. Engineered control of cell morphology in vivo reveals distinct roles for yeast and filamentous forms of candida albicans during infection. *Eukaryot Cell*. 2003; **2**: 1053-1060.
- 261 Girmenia C, Martino P, De Bernardis F, Cassone A. Assessment of detection of candida mannoproteinemia as a method to differentiate central venous catheter-related candidemia from invasive disease. *Journal of clinical microbiology*. 1997; **35**: 903-906.
- 262 Ponton J, Jones JM. Analysis of cell wall extracts of candida albicans by sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis and western blot techniques. *Infect Immun*. 1986; **53**: 565-572.
- 263 Moragues MD, Ortiz N, Iruretagoyena JR, et al. [evaluation of a new commercial test (candida albicans ifa igg) for the serodiagnosis of invasive candidiasis]. *Enfermedades infecciosas y microbiología clínica*. 2004; **22**: 83-88.
- 264 Buschart A, Eickhoff H, Hohn E, Bilitewski U. Identification of inhibitors of yeast-to-hyphae transition in candida albicans by a reporter screening assay. *J Biotechnol*. 2012.



- 265 Ponton J, del Palacio A. [advances and limitations in the early diagnosis of invasive yeast infections]. *Revista iberoamericana de micología*. 2007; **24**: 181-186.
- 266 Brunke S, Hube B. Two unlike cousins: *Candida albicans* and *C. Glabrata* infection strategies. *Cell Microbiol*. 2013; **15**: 701-708.
- 267 Zaragoza R, Peman J, Quindos G, et al. Kinetic patterns of *Candida albicans* germ tube antibody in critically ill patients: Influence on mortality. *Clinical and vaccine immunology : CVI*. 2009; **16**: 1527-1528.
- 268 Peman J, Zaragoza R. [towards an early diagnosis of invasive candidiasis in the critically ill patient]. *Revista iberoamericana de micología*. 2012; **29**: 71-75.
- 269 Morrell M, Fraser VJ, Kollef MH. Delaying the empiric treatment of *Candida* bloodstream infection until positive blood culture results are obtained: A potential risk factor for hospital mortality. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2005; **49**: 3640-3645.
- 270 Horvath LL, George BJ, Hospenthal DR. Detection of fifteen species of *Candida* in an automated blood culture system. *Journal of clinical microbiology*. 2007; **45**: 3062-3064.
- 271 Marchetti O, Lamothe F, Mikulska M, Viscoli C, Verweij P, Bretagne S. ECIL recommendations for the use of biological markers for the diagnosis of invasive fungal diseases in leukemic patients and hematopoietic SCT recipients. *Bone Marrow Transplant*. 2012; **47**: 846-854.
- 272 Llinares Mondéjar P, ZCR, Maseda Garrido E, Ferrer Roca R, y col. Epico project. Development of educational recommendations using the Delphi technique on invasive candidiasis in non-neutropenic critically ill adult patients. *Rev Esp Quimioter*. 2013; **26**: 131-150.
- 273 Brissaud O, Guichoux J, Harambat J, Tandonnet O, Zaoutis T. Invasive fungal disease in PICU: Epidemiology and risk factors. *Ann Intensive Care*. 2012; **2**: 6.
- 274 Prella M, Bille J, Pugnale M, et al. Early diagnosis of invasive candidiasis with mannan antigenemia and antimannan antibodies. *Diagnostic microbiology and infectious disease*. 2005; **51**: 95-101.
- 275 Leon C, Ruiz-Santana S, Saavedra P, et al. Value of beta-D-glucan and *Candida albicans* germ tube antibody for discriminating between *Candida* colonization and invasive candidiasis in patients with severe abdominal conditions. *Intensive care medicine*. 2012; **38**: 1315-1325.
- 276 Pickering JW, Sant HW, Bowles CA, Roberts WL, Woods GL. Evaluation of a (1->3)-beta-D-glucan assay for diagnosis of invasive fungal infections. *Journal of clinical microbiology*. 2005; **43**: 5957-5962.
- 277 Ogawa M, Hori H, Niiguchi S, Azuma E, Komada Y. False-positive plasma (1->3)-beta-D-glucan test following immunoglobulin product replacement in an adult bone marrow recipient. *Int J Hematol*. 2004; **80**: 97-98.
- 278 Marty FM, Koo S. Role of (1->3)-beta-D-glucan in the diagnosis of invasive aspergillosis. *Medical mycology : official publication of the International Society for Human and Animal Mycology*. 2009; **47 Suppl 1**: S233-240.
- 279 Mennink-Kersten MA, Warris A, Verweij PE. 1,3-beta-D-glucan in patients receiving intravenous amoxicillin-clavulanic acid. *N Engl J Med*. 2006; **354**: 2834-2835.
- 280 Nagasawa K, Yano T, Kitabayashi G, et al. Experimental proof of contamination of blood components by (1->3)-beta-D-glucan caused by filtration with cellulose filters in the manufacturing process. *J Artif Organs*. 2003; **6**: 49-54.

- 281 Usami M, Ohata A, Horiuchi T, Nagasawa K, Wakabayashi T, Tanaka S. Positive (1-->3)-beta-d-glucan in blood components and release of (1-->3)-beta-d-glucan from depth-type membrane filters for blood processing. *Transfusion*. 2002; **42**: 1189-1195.
- 282 Racil Z, Kocmanova I, Toskova M, et al. Reactivity of the 1,3-beta-d-glucan assay during bacteraemia: Limited evidence from a prospective study. *Mycoses*. 2013; **56**: 101-104.
- 283 Olaechea-Astigarraga PM, Alvarez-Lerma F, Palomar-Martinez M, et al. [trends in systemic antifungal use in critically ill patients. Multicenter observational study, 2006-2010]. *Enfermedades infecciosas y microbiología clinica*. 2012; **30**: 435-440.
- 284 Bruyere R, Quenot JP, Prin S, et al. Empirical antifungal therapy with an echinocandin in critically-ill patients: Prospective evaluation of a pragmatic candida "score"-based strategy in one medical icu. *BMC Infect Dis*. 2014; **14**: 385.
- 285 Ma CF, Li FQ, Shi LN, et al. Surveillance study of species distribution, antifungal susceptibility and mortality of nosocomial candidemia in a tertiary care hospital in china. *BMC Infect Dis*. 2013; **13**: 337.
- 286 Tortorano AM, Prigitano A, Lazzarini C, et al. A 1-year prospective survey of candidemia in italy and changing epidemiology over one decade. *Infection*. 2013; **41**: 655-662.
- 287 Pazos C, Moragues MD, Quindos G, Ponton J, del Palacio A. Diagnostic potential of (1,3)-beta-d-glucan and anti-candida albicans germ tube antibodies for the diagnosis and therapeutic monitoring of invasive candidiasis in neutropenic adult patients. *Revista iberoamericana de micología*. 2006; **23**: 209-215.
- 288 Lenz P, Eckelskemper F, Erichsen T, et al. Prospective observational multicenter study to define a diagnostic algorithm for biliary candidiasis. *World journal of gastroenterology : WJG*. 2014; **20**: 12260-12268.

## ANEXOS



**Objetivo 3. Material suplementario**

**Tabla 2.** Análisis de los biomarcadores solos y en combinación, según los modelos 1 y 2; y para los casos de CI probada y CI probada + probable.

	Type of IC as true positive value	Sensitivity % (95% CI)	Specificity % (95% CI)	PPV % (95% CI)	NPV % (95% CI)
CAGTA D0	Proven	53.3 (34.6-71.2)	90.0 (79.9-95.5)	69.6 (47.0-85.9)	81.8 (71.0-89.4)
CAGTA D3		60.0 (40.7-76.8)	87.1 (76.5-93.6)	66.7 (46.0-82.8)	83.6 (72.6-90.9)
CAGTA D5		60.0 (40.7-76.8)	85.7 (74.8-92.6)	64.3 (44.1-80.7)	83.3 (72.3-90.7)
CAGTA D0	Proven + probable	50.0 (34.3-65.6)	96.5 (87.0-99.4)	91.3 (70.5-98.5)	72.7 (61.2-82.0)
CAGTA D3		54.8 (38.8-69.8)	93.1 (82.4-97.8)	85.2 (65.4-95.1)	74.0 (62.2-83.2)
CAGTA D5		54.8 (38.8-69.8)	91.4 (80.3-96.8)	82.1 (62.4-93.2)	73.6 (61.7-83.0)
Model 1 CAGTA	Proven	60.0 (40.7-76.8)	85.7 (74.8-92.6)	64.3 (44.1-80.7)	83.3 (72.3-90.7)
	Proven + probable	54.8 (38.8-69.8)	91.4 (80.3-96.8)	82.1 (62.4-93.2)	73.6 (61.7-83.0)
Model 2 CAGTA	Proven	60.0 (40.7-76.8)	87.1 (76.5-93.6)	66.7 (46.0-82.8)	83.6 (72.6-90.9)
	Proven + probable	54.8 (38.8-69.8)	93.1 (82.4-97.8)	85.2 (65.4-95.1)	74.0 (62.2-83.2)
BDG D0	Proven	66.7 (47.1-82.1)	65.7 (53.3-76.4)	45.4 (30.7-61.0)	82.1 (69.1-90.7)
BDG D3		73.3 (53.8-87.0)	64.3 (51.9-75.1)	46.8 (32.4-61.8)	84.9 (71.8-92.8)
BDG D5		80.0 (60.9-91.6)	67.1 (54.8-77.6)	51.1 (36.3-65.7)	88.9 (76.3-95.3)
BDG D0	Proven + probable	64.3 (48.0-78.0)	70.7 (57.1-81.5)	61.4 (45.5-75.2)	73.2 (59.5-83.8)
BDG D3		69.0 (52.8-81.9)	69.0 (55.3-80.1)	61.7 (46.4-75.1)	75.5 (61.4-85.8)
BDG D5		71.4 (55.2-83.8)	70.7 (57.1-81.5)	63.8 (48.5-76.9)	77.4 (63.4-87.3)
Model 1 BDG	Proven	86.7 (68.4-95.6)	52.9 (40.6-64.8)	44.1 (31.4-57.5)	90.2 (75.9-96.8)
	Proven + probable	78.6 (62.8-89.2)	55.2 (41.6-68.0)	55.9 (42.5-68.6)	78.0 (62.0-88.9)
Model 2 BDG	Proven	73.3 (53.8-87.0)	70.0 (57.1-80.1)	51.2 (35.7-66.4)	86.0 (73.6-93.3)
	Proven + probable	69.0 (52.8-81.9)	75.9 (62.5-85.7)	67.4 (51.3-80.5)	77.2 (63.8-86.8)
CAGTA/BDG D0	Proven	80.0 (60.9-91.6)	60.0 (47.6-71.3)	46.1 (32.5-60.4)	87.5 (74.1-94.8)

CAGTA/BDG D3		83.3 (64.5-93.7)	58.6 (46.2-70.0)	46.3 (32.8-60.3)	89.1 (75.6-95.9)
CAGTA/BDG D5		93.3 (76.5-98.8)	61.4 (49.0-72.6)	50.9 (37.2-64.5)	95.6 (83.6-99.2)
CAGTA/BDG D0+D3		86.7 (68.4-95.6)	51.4 (39.3-63.4)	43.3 (30.8-56.7)	90.0 (75.4-96.7)
CAGTA/BDG D3 +D5		93.3 (76.5-98.8)	52.9 (40.6-64.8)	45.9 (33.3-59.1)	94.9 (81.4-99.1)
CAGTA/BDG D0	Proven + probable	80.9 (65.4-90.9)	69.0 (55.3-80.1)	65.4 (50.8-77.7)	83.3 (69.2-92.0)
CAGTA/BDG D3		83.3 (68.0-92.5)	67.2 (53.5-78.6)	64.8 (50.5-77.0)	84.8 (70.5-93.2)
CAGTA/BDG D5		88.1 (73.6-95.5)	69.0 (55.3-80.1)	67.3 (53.2-78.9)	88.9 (75.1-95.8)
CAGTA/BDG D0+D3		85.7 (70.8-94.1)	41.4 (28.9-55.0)	51.4 (39.3-63.4)	80.0 (60.9-91.6)
CAGTA/BDG D3 and D5		90.5 (76.4-96.9)	39.7 (27.3-53.4)	52.0 (40.1-63.8)	85.2 (65.4-95.1)
Model 1 CAGTA/BDG	Proven	96.7 (80.9-99.8)	47.1 (35.4-59.4)	43.9 (31.9-56.6)	97.1 (82.9-99.8)
	Proven + probable	92.9 (79.4-98.1)	53.4 (40.0-66.5)	59.1 (46.3-70.8)	91.2 (75.2-97.7)
Model 2 CAGTA/BDG	Proven	83.3 (64.5-93.7)	64.3 (51.9-75.1)	50.0 (35.7-64.3)	90.0 (77.4-96.3)
	Proven + probable	83.3 (68.0-92.5)	74.1 (60.7-84.3)	70.0 (55.2-81.7)	86.0 (72.6-93.7)

Combination CAGTA/BDG was considered positive if at least CAGTA and/or BDG were positive. CAGTA: *Candida albicans* germ tube antibody test.

BDG: (1-3)-beta-D-glucan test. Model 1 (non-restrictive model): if at least 1 test result (CAGTA or BDG) was positive on any of the 3 days.

## PUBLICACIONES

## ESTUDIO 1

<http://mmy.oxfordjournals.org/content/52/3/270.full.pdf+html?sid=b077f1d9-f655-41c5-b91d-2546f13b17ec>



*Medical Mycology*, 2014, 52, 270–275  
doi: 10.1093/mmy/myt025  
Advance Access Publication Date: 21 March 2014  
Original Article



## Original Article

## Potential role of *Candida albicans* germ tube antibody in the diagnosis of deep-seated candidemia

M. Carmen Martínez-Jiménez<sup>1,2</sup>, Patricia Muñoz<sup>1,2,3,4,\*</sup>,  
Jesús Guinea<sup>1,2,3,4</sup>, Maricela Valerio<sup>1,2</sup>, Roberto Alonso<sup>1,2</sup>,  
Pilar Escribano<sup>1,2,3</sup> and Emilio Bouza<sup>1,2,3,4</sup>

<sup>1</sup>Clinical Microbiology and Infectious Diseases Department, Hospital General Universitario Gregorio Marañón, Universidad Complutense de Madrid, Madrid, <sup>2</sup>Instituto de Investigación Sanitaria del Hospital Gregorio Marañón, Madrid, <sup>3</sup>CIBER de Enfermedades Respiratorias (CIBER RES CB06/06/0058), Palma de Mallorca and <sup>4</sup>Medicine Department, Faculty of Medicine, Universidad Complutense de Madrid, Madrid, Spain

\*To whom correspondence should be addressed. Patricia Muñoz, Servicio de Microbiología Clínica y Enfermedades Infecciosas, Hospital General Universitario Gregorio Marañón, C/ Dr. Esquerdo 46, 28007 Madrid, Spain. Tel: +34-91-586 71 63; Fax: +34-91-504 49 06; E-mail: [pmunoz@micro.hggm.es](mailto:pmunoz@micro.hggm.es)

Received 4 June 2013; Revised 25 September 2013; Accepted 21 November 2013

## ESTUDIO 2

<http://jac.oxfordjournals.org/content/70/8/2354.full.pdf+html>

Journal of Antimicrobial Chemotherapy Advance Access published April 21, 2015

*J Antimicrob Chemother*  
doi:10.1093/jac/dkv090

**Journal of  
Antimicrobial  
Chemotherapy**

## ***Candida* biomarkers in patients with candidaemia and bacteraemia**

**M. Carmen Martínez-Jiménez<sup>1,2</sup>, Patricia Muñoz<sup>1-4\*</sup>, Maricela Valerio<sup>1,2</sup>, Roberto Alonso<sup>1,2</sup>, Carmen Martos<sup>1</sup>,  
Jesús Guinea<sup>1-3</sup> and Emilio Bouza<sup>1-4</sup>**

<sup>1</sup>Clinical Microbiology and Infectious Disease Department, Hospital General Universitario Gregorio Marañón, Madrid, Spain; <sup>2</sup>Instituto de Investigación Sanitaria del Hospital Gregorio Marañón, Madrid, Spain; <sup>3</sup>CIBER Enfermedades Respiratorias—CIBERES (CB06/06/0058), Madrid, Spain; <sup>4</sup>Medicine Department, School of Medicine, Universidad Complutense de Madrid, Madrid, Spain

\*Corresponding author. Servicio de Microbiología Clínica y Enfermedades Infecciosas, Hospital General Universitario Gregorio Marañón, C/ Dr. Esquerdo, 46, 28007 Madrid, Spain. Tel: +34-91-586-71-63; Fax: +34-91-504-49-06; E-mail: pmunoz@micro.hggm.es

Received 30 September 2014; returned 28 November 2014; revised 5 February 2015; accepted 18 March 2015

## ESTUDIO 3

<http://jac.oxfordjournals.org/content/early/2015/08/20/jac.dkv241.long>

*J Antimicrob Chemother*  
doi:10.1093/jac/dkv241

**Journal of  
Antimicrobial  
Chemotherapy**

**Combination of *Candida* biomarkers in patients receiving empirical antifungal therapy in a Spanish tertiary hospital: a potential role in reducing the duration of treatment**

**M. Carmen Martínez-Jiménez<sup>1,2</sup>, Patricia Muñoz<sup>1-4\*</sup>, Maricela Valerio<sup>1,2</sup>, Antonio Vena<sup>1,2</sup>,  
Jesús Guinea<sup>1-3</sup> and Emilio Bouza<sup>1-4</sup>**

<sup>1</sup>Clinical Microbiology and Infectious Diseases Department, Hospital General Universitario Gregorio Marañón, Madrid, Spain; <sup>2</sup>Instituto de Investigación Sanitaria del Hospital Gregorio Marañón, Madrid, Spain; <sup>3</sup>CIBER Enfermedades Respiratorias-CIBERES (CB06/06/0058), Madrid, Spain; <sup>4</sup>Medicine Department, School of Medicine, Universidad Complutense de Madrid, Madrid, Spain

\*Corresponding author. Servicio de Microbiología Clínica y Enfermedades Infecciosas, Hospital General Universitario Gregorio Marañón, C/ Dr Esquerdo 46, 28007 Madrid, Spain. Tel: +34-91-586-6725; Fax: +34-91-504-4906; E-mail: pmunoz@hggm.es

Received 12 March 2015; returned 8 June 2015; revised 12 July 2015; accepted 13 July 2015



## Original Article

# Potential role of *Candida albicans* germ tube antibody in the diagnosis of deep-seated candidemia

M. Carmen Martínez-Jiménez<sup>1,2</sup>, Patricia Muñoz<sup>1,2,3,4,\*</sup>,  
Jesús Guinea<sup>1,2,3,4</sup>, Maricela Valerio<sup>1,2</sup>, Roberto Alonso<sup>1,2</sup>,  
Pilar Escribano<sup>1,2,3</sup> and Emilio Bouza<sup>1,2,3,4</sup>

<sup>1</sup>Clinical Microbiology and Infectious Diseases Department, Hospital General Universitario Gregorio Marañón, Universidad Complutense de Madrid, Madrid, <sup>2</sup>Instituto de Investigación Sanitaria del Hospital Gregorio Marañón, Madrid, <sup>3</sup>CIBER de Enfermedades Respiratorias (CIBER RES CB06/06/0058), Palma de Mallorca and <sup>4</sup>Medicine Department, Faculty of Medicine, Universidad Complutense de Madrid, Madrid, Spain

\*To whom correspondence should be addressed. Patricia Muñoz, Servicio de Microbiología Clínica y Enfermedades Infecciosas, Hospital General Universitario Gregorio Marañón, C/ Dr. Esquerdo 46, 28007 Madrid, Spain. Tel: +34-91-586 71 63; Fax: +34-91-504 49 06; E-mail: [pmunoz@micro.hggm.es](mailto:pmunoz@micro.hggm.es)

Received 4 June 2013; Revised 25 September 2013; Accepted 21 November 2013

## Abstract

Patients with candidemia may have transient or catheter-related infections without involvement of deep tissues or deep-seated candidiasis. Clinical differentiation of these entities may not be evident with conventional microbiological and imaging methods. Our aim was to determine if the detection of *Candida albicans* germ tube-specific antibody (CAGTA) in patients with candidemia was related to the extent of the disease. This study was conducted from 2003 to 2012 with 50 patients diagnosed as having candidemia, that is, 29 with deep-seated candidiasis and 21 with non-deep-seated candidiasis. The most common species recovered from samples obtained from these patients were *C. albicans*, 40%; *C. tropicalis*, 20%; *C. parapsilosis*, 18%; and *C. glabrata*, 12%. Serum samples were processed according to the manufacturer's recommendations (Viracell Microbiologist S.L., Granada, Spain). The CAGTA tests were positive in 1/21 non-deep-seated candidemias (DSCs; 4.76%) and 20/29 DSCs (68.96%;  $P < 0.01$ ). Accordingly, the values for specificity and positive predictive values of CAGTA for identifying DSC were 95%. We concluded that the presence of a positive CAGTA test in a sample from a patient with candidemia suggests deep-seated candidiasis. Extension screening studies should be considered and origins other than catheters should be searched. Prospective studies are needed to determine the clinical implications of this finding and its potential use in defining the optimal duration of therapy.

**Key words:** deep-seated candidiasis, *Candida albicans* germ tube-specific antibody (CAGTA), candidemia.



## Introduction

Patients with candidemia may have transient or catheter-related infections without involvement of deep tissues or deep-seated candidiasis [1,2]. Clinical differentiation of these entities may not be evident with conventional microbiological and imaging methods. The identification of these subpopulations by means of circulating surrogate biomarkers could be useful to indicate the need for extension screening tests and even to help determine the length of therapy.

*Candida albicans* germ tube-specific antibody (invasive candidiasis [CAGTA] immunofluorescence assay (IFA) immunoglobulin G [IgG]; Vircell Microbiologist S.L., Granada, Spain) is a commercially available indirect immunofluorescence test that allows the detection of antimycelium antibodies against several *Candida* spp. The detection of CAGTA in serum specimens of patients with candidemia and/or invasive candidiasis has shown a sensitivity of 84.4%–96% and a specificity of 94.7%–100% [3,4]. The test has also been assayed in serum samples from hematologically and critically ill patients at risk of invasive candidiasis, showing high sensitivity (84%–87%) and specificity (94.7%–95%) [5,6].

Positive serum CAGTA detection is suggestive of deep-seated candidiasis in which *Candida* hyphae invade different body tissues [7,8]. Hyphae contain hwp1 antigens that promote the production of CAGTA [9,10]. Our hypothesis was that patients with candidemia and a positive CAGTA should be considered as having invasive candidiasis. The results presented here confirm this theory.

## Material and methods

The study included 50 adult patients who were diagnosed as having candidemia between 2003 and 2012 and had available serum samples that were collected within 48 h after the initial diagnosis of candidemia. Serum samples were also obtained from a control group of 50 healthy individuals. All samples were stored at  $-70^{\circ}\text{C}$  until processing.

Candidemia was defined as the isolation of *Candida* spp. from at least one blood specimen obtained from a peripheral vein [11]. We defined proven deep-seated candidemia (DSC), following Leroy et al. [12], as the isolation of a yeast from at least one sample, as well as its recovery from another specimen from a normally sterile site that is related to a specific focus on infection. We also accepted as probable DSC, patients with candidemia and a clinically documented site of infection without microbiological confirmation of *Candida* spp. and no other etiology, for example, candidemic patients with chorioretinitis or intraabdominal infection. The source of candidemia was established according to standard clinical, imaging, and microbiological criteria. Each case was reviewed independently by three investigators blind to the CAGTA results.

*Candida* species was identified using ID 32C (bioMérieux, Marcy l'Etoile, France). Clinical characteristics of the episodes were obtained from our database of bloodstream infections, and all records were reviewed according to a preestablished protocol. Demographic information and presence of underlying conditions were recorded.

## Serological detection of CAGTA

Serum samples were processed according to the manufacturer's recommendations (Vircell Microbiologist S.L., Granada, Spain). Briefly, serum samples were diluted (1:4) in phosphate-buffered saline; 20  $\mu\text{L}$  of the resulting solution was added to 80  $\mu\text{L}$  of sorbent (*Candida albicans* aliquots in yeast phase) to achieve a 1:20 dilution of the sample. A total of 20  $\mu\text{L}$  of this solution was deposited in each well of the slide where *Candida albicans* mycelial-phase antigens were fixed. Subsequently, antihuman IgG antibodies labeled with fluorescein were added. The samples were interpreted as positive if green fluorescence was observed at the mycelial phase and blastoconidia were stained red. Positive samples were diluted to obtain the titer. Samples were positive considering a cutoff  $\geq 1/160$ . Indeterminate results were retested, and the second result was considered.

## Statistical analysis

Patients with and without DSC were compared. We used the two-tailed Fisher exact test to study the correlation between CAGTA positivity and DSC. Sensitivity, specificity, positive and negative predictive values, and accuracy of the CAGTA test for the diagnosis of DSC were studied. A  $P$  value  $< 0.05$  was considered statistically significant. Data were entered in a database created using Access 2003, and SPSS 16.0 was used for statistical analysis (IBM, SPSS Statistic; Armonk, New York).

## Ethical and legal issues

The study was approved by the local ethics committee (CEIC-A1 (Comité ético de investigación científica del Área 1 del Hospital General Universitario Gregorio Marañón), Ref. 350/12) and by the Spanish competent authorities (Agencia Española del Medicamento y Productos Sanitarios). Due to the retrospective design of the study, the ethics committee waived the need for informed consent from study participants.

## Results

The patients' demographic and clinical data are summarized in Table 1. Mean age of the patient population was  $64.6 \pm 15.6$  years and their main underlying

**Table 1.** Characteristics of the 50 patients with deep-seated and non-deep-seated candidemia.

Characteristic	Total ( <i>n</i> = 50;%)	Non-deep-seated candidemia ( <i>n</i> = 21;%)	Deep-seated candidemia ( <i>n</i> = 29;%)	<i>P</i> value
Sex				0.340
Male	27 (54)	13 (62)	14 (48)	
Female	23 (46)	8 (38)	15 (52)	
Mean age (y)	64.64 ± 15.9	66 ± 13.6	63.6 ± 17.6	0.423
Type of ward when admitted				
Surgical	24 (48)	10 (47.6)	14 (48.3)	0.963
Medical	15 (30)	6 (28.6)	9 (31)	0.851
Oncohematology	9 (18)	4 (19)	5 (17.2)	0.870
Intensive care	2 (4)	1 (4.8)	1 (3.4)	0.815
Underlying condition				
Gastrointestinal disease	26 (52)	9 (42.9)	17 (58.6)	0.271
Solid tumor	20 (40)	7 (33.3)	13 (44.8)	0.413
Liver disease	14 (28)	7 (33.3)	7 (24.1)	0.475
Genitourinary disease	10 (20)	3 (14.3)	7 (24.1)	0.390
Cardiovascular	10 (20)	5 (23.8)	5 (17.2)	0.567
Renal insufficiency	10 (20)	3 (14.3)	7 (24.1)	0.390
Diabetes	8 (16)	5 (23.8)	3 (10.3)	0.200
Hematologic disease	7 (14)	4 (19)	3 (10.3)	0.381
Lung disease	6 (12)	3 (14.3)	3 (10.3)	0.672
Stem cell transplantation	2 (4)	1 (4.8)	1 (3.4)	0.815
Human immunodeficiency virus infection	2 (4)	0 (0)	2 (6.8)	0.219
Solid organ transplantation	1 (2)	1 (4.8)	0 (0)	0.235
Number of days of hospital stay related to the diagnosis of candidemia (median ± standard deviation)	21 ± 51.7	23 ± 70.8	18 ± 27.9	0.274
Risk factors for candidiasis				
Intravenous catheter	48 (96)	21 (100)	27 (93.1)	0.219
Surgery	26 (52)	9 (42.9)	17 (58.6)	0.271
Indwelling bladder device	23 (46)	11 (52.4)	12 (41.4)	0.441
Total parenteral nutrition	20 (40)	9 (42.9)	11 (37.9)	0.726
Mechanical ventilation	15 (30)	8 (38.1)	7 (24.1)	0.288
Abdominal surgery	13 (26)	4 (19)	9 (31)	0.340
Immunosuppression	11 (22)	5 (23.8)	6 (20.7)	0.793
Hemodialysis	9 (18)	6 (28.6)	3 (10.3)	0.098
<i>Candida</i> species				
<i>C. albicans</i>	20 (40%)	6 (28.6%)	14 (48.3)	0.160
<i>C. tropicalis</i>	10 (20%)	4 (19%)	6 (20.7)	0.886
<i>C. parapsilosis</i>	9 (18%)	6 (28.6%)	3 (10.3)	0.098
<i>C. glabrata</i>	6 (12%)	2 (9.5%)	4 (13.8)	0.647
<i>C. krusei</i>	3 (6%)	1 (4.8%)	2 (6.9)	0.754
<i>C. lusitaniae</i>	1 (2)	1 (4.8)	-	0.235
<i>C. albicans</i> + <i>C. glabrata</i>	1 (2)	1 (4.8)	-	0.235
Source of fungemia				
Catheter	19 (38)	16 (76.2)	3 (10.3%)	<0.01
Primary	9 (18)	5 (23.8)	4 (13.8)	0.363
Urine	6 (12)	-	6 (20.7%)	0.026
Intraabdominal	10 (20)	-	10 (34.5)	0.003
Other*	6 (12)	-	6 (20.7)	0.026
Overall mortality	23 (46)	10 (47.6)	13 (44.8)	0.845
Related mortality (0–7)	12 (24)	5 (23.8)	7 (24.1)	0.979

\*Other origins: perianal cellulitis in neutropenic patient (*n* = 2), endocarditis (*n* = 2), meningitis (*n* = 1), and empyema (*n* = 1).



**Table 2.** Results of *Candida albicans* germ tube-specific antibody determinations in serum samples from the 50 patients with candidemia.

Candidemia origin		CAGTA + (%)	CAGTA-(%)	P value
All species	Deep-seated candidiasis	20 (68.9)	9 (31.0)	< 0.001
	Non-deep-seated candidiasis	1 (4.7)	20 (95.2)	< 0.001
<i>C. albicans</i>	Deep-seated candidiasis	12 (85.7)	2 (14.3)	0.060
	Non-deep-seated candidiasis	1 (16.7)	5 (83.3)	0.105
<i>C. tropicalis</i>	Deep-seated candidiasis	2 (33.3)	4 (66.7)	0.034
	Non-deep-seated candidiasis	0 (0.0)	4 (100)	0.619
<i>C. parapsilosis</i>	Deep-seated candidiasis	3 (100)	0 (0)	0.220
	Non-deep-seated candidiasis	0 (0)	6 (100)	0.517
<i>C. glabrata</i>	Deep-seated candidiasis	3 (75.0)	1 (25.0)	0.779
	Non-deep-seated candidiasis	0 (0.0)	2 (100)	0.740

CAGTA determinations are globally shown for all patients with and without deep-seated candidemia and for the most prevalent species separately.

CAGTA, *Candida albicans* germ tube-specific antibody.

conditions were gastrointestinal diseases (52%) and solid tumors (40%). Risk factors for candidemia included, among others, the use of intravascular catheters (96%), recent surgery (52%), indwelling bladder catheters (46%), and total parenteral nutrition (40%). Most commonly recovered species were *C. albicans* (40%) and *C. tropicalis* (20%). Overall, 46% of the patients died during their hospitalization.

Of the 50 episodes of candidemia, 21 (42%) were classified as non-DSC, including 16 catheter-related infections (76.2%) and 5 primary fungemias. The remaining 29 cases were considered to be DSC, with most of these patients having intraabdominal (14) or urinary tract infections with obstruction (8). Additional sites of infection included three endovascular, two chorioretinitis, two perianal cellulitis in neutropenic patients, and one case each of meningitis, empyema, vertebral osteomyelitis, and disseminated skin lesions, with four patients having infections at more than one site.

Overall, 16 DSC cases were microbiologically proven (55.2%) and 13 were clinically diagnosed (1 nonoperated endocarditis, 1 chorioretinitis, 1 urologic sepsis, and 10 intraabdominal candidiasis), with no sample sent to the microbiology laboratory for analysis.

Overall, 21/50 serum samples obtained within 48 h of the candidemia (42%) were found to be positive with the CAGTA, of which 1/21 specimens were obtained from a patient with non-DSC and 20/29 of samples from DSC individuals (4.76% vs. 68.96%;  $P < 0.01$ ; Table 2). Accordingly, validity values (95% confidence interval [CI]) of a single early CAGTA-positive test result to confirm DSC were as follows: sensitivity (S), 68.97% (49.05%–84.02%); specificity (Sp), 95.24% (74.13%–99.75%); positive predictive value, 95.24% (74.13%–99.75%); negative predictive value, 68.97% (49.05%–84.02%); and accuracy 80% (65.86%–89.50%). The proportion of positive CAGTA in

patients with DSC was similar in clinically and microbiologically proven cases (69.2% vs. 68.8%).

The S and Sp of CAGTA for the discrimination of DSC in patients with candidemias caused by the most prevalent species were as follows: *C. albicans*: S 85.7% (95% CI, 56.1%–97.5%), Sp 83.3% (95% CI, 56.5%–99.1%); *C. tropicalis*: S 33.3% (95% CI, 6%–75.9%), Sp 100% (95% CI, 39.6%–97.6%); *C. parapsilosis*: S 100% (95% CI, 62.9%–99%), Sp 100% (95% CI, 56.1%–97.5%); and *C. glabrata*: S 75% (95% CI, 21.9%–98.7%), Sp 100% (95% CI, 19.8%–95.1%; Table 2).

The patient classified as non-DSC who presented a “false-positive” CAGTA was a 53-year-old male diagnosed with idiopathic thrombocytopenic purpura after suffering two neurological events for which he was receiving rituximab. He required multiple intensive care unit (ICU) admissions and plasmapheresis and remained in the hospital for 6 months. We were able to demonstrate only catheter-related candidemia (catheter hub and blood cultures both with *C. albicans*), although other sources could not be completely excluded due to his terminal condition.

The nine patients with DSC and false-negative CAGTAs corresponded to five immunosuppressed patients (two infected with human immunodeficiency virus and three hematological patients), three patients with neoplasia (one hepatocarcinoma and two gastric cancers), and one patient with advanced diabetes mellitus and permanent indwelling bladder catheter. False-negative CAGTA was significantly associated with immunosuppression (83.3% vs. 17.4%;  $P < 0.01$ ), severity of the disease as reflected in the Pitt score ( $4 \pm 3.8$  vs.  $1.9 \pm 2$ ;  $P = 0.06$ ), need for mechanical ventilation (71.4% vs. 19.2%;  $P = 0.008$ ), and candidemia caused by *C. krusei* or *C. tropicalis* (75% vs. 14.3%;  $P = 0.004$ ).

The overall mortality rate was similar in patients with negative and positive CAGTA: 48% vs. 43%;  $P = 0.8$ . However, early mortality (first 7 days) was higher in

patients with negative CAGTA (34.5% vs. 9.5%;  $P = 0.04$ ). We did not find a clear association between CAGTA titers and overall mortality: negative CAGTA: 14/29 (48.3%), 1/160: 3/9 (33.3%), >1/160: 6/12 (50%);  $P = 0.7$ . Early mortality rates in patients with different CAGTA titers were as follows: negative CAGTA (<1/160): 34.5%, 1/160: 0%, >1/160: 16.7%;  $P = 0.08$ .

### Control group

The average age of the 50 healthy individuals in the control group was  $38.5 \pm 11.6$  years, and 16 (32%) were men. None had an active infection at the time of the study, with the exception of one person who suffered from recurrent *Candida* vaginitis. All control samples yielded negative CAGTA determinations ( $\leq 1/20$ ).

### Discussion

Our data show that a positive CAGTA result in a patient with candidemia is very suggestive of deep-seated candidiasis, which may have diagnostic and therapeutic implications.

Recent studies indicate that patients with invasive candidiasis should be classified into the following three groups: candidemia without deep-seated candidiasis, candidemia associated with deep-seated candidiasis, and deep-seated candidiasis not associated with candidemia. In a recent study performed in French ICUs, it was found that 39.5% of the patients were classified as having isolated candidemia, 28.4% as having candidemia with invasive candidiasis, and 32.1% as having invasive candidiasis without documented candidemia [12]. Considering that blood cultures are estimated to have a sensitivity of 50% when diagnosing invasive candidiasis, nonculture methods will disclose half of the deep-seated candidiasis in the second group and all cases in the third group [1].

It may be difficult to differentiate between candidemic patients with or without deep-seated candidiasis when clinical manifestations are unspecific or when invasive sampling procedures are contraindicated. Cultures inoculated with samples from deep tissues may also become negative after some days of antifungal therapy. The identification of DSC is important because these patients may require more prolonged therapy or surgical debridement. The potential use of nonculture diagnostic tests for DSC has been emphasized in a recent study by Nguyen et al. [2]. Blood cultures, beta-D-glucan assay (BDG), and a quantitative real-time polymerase chain reaction (RT-PCR) assay were compared in a population in which 60% of patients had DSC in the absence of positive blood cultures. Both PCR and BDG proved to be superior to blood cultures among patients with DSC (88% and 62% vs. 17%, respectively). Girmenia

et al. reported that mannoproteinemia was observed in 7% of patients with transient or catheter-related candidemia but in 76% of patients with persistent candidemia or invasive candidiasis [13]. We believe that in the near future, the proportion of patients with invasive candidiasis but without candidemia will increase with the widespread adoption of new diagnostic techniques.

The CAGTA test consists of an immunofluorescence assay to detect antibodies against an antigen of the mycelial phase of *C. albicans*, hwp1, that is essential for biofilm development and tissue invasion [3,14,15]. Although the technique was originally designed for *C. albicans*, it has been shown that other *Candida* species, including *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. glabrata*, *C. dubliniensis*, *C. guilliermondii*, and *C. krusei*, are able to produce CAGTA to a greater or lesser degree [3,7,16,17]. In our experience, the accuracy of the CAGTA test was similar for all *Candida* species, with the exception of *C. tropicalis*, which showed a lower sensitivity (33%) and retained a very high specificity (100%). The reason for this apparent lower accuracy of CAGTA remains to be investigated. CAGTA yielded an S of 75% with 100% Sp for *C. glabrata* candidemias, despite the fact that this yeast has never been shown to produce hyphae. However, it may produce pseudohyphae, which could account for the positive CAGTA result [18]. A positive CAGTA test is thus suggestive of deep-seated disease caused by any of these species.

Suggested cutoffs differ with the type of patient, 1/20 is recommended for hematological patients and 1/160 for all other patients [3,5]. One advantage of this technique when compared with other nonculture diagnostic methods is its reduced price (approximately 10€ (\$13.65 US) per determination) and its relatively rapid turnover (3 h total, with 20 min of hands-on time).

There are not many clinical studies of the use of this test and no published reports correlate the production of CAGTA with the source or the extent of *Candida* bloodstream infection. Pemán and colleagues suggested that systematic CAGTA serum determinations from critically ill patients at risk of invasive candidiasis were good markers for administration of empirical antifungal drugs [6]. The test may also be useful when measuring the response to antifungal treatment in this group of patients [19] and could even help predict patient outcomes. In our series, the mortality rate was similar in patients with and without DSC candidemia (47% and 44%, respectively). These results are in agreement with those of Leroy et al., who reported fatal outcomes of 47.7% among patients with isolated candidemia, 48.7% in candidemic patients with invasive candidiasis, and 41% in patients with invasive candidiasis without documented candidemia [12]. However, patients who died within the first 7 days after candidemia usually had a

negative CAGTA. Other authors have also found that intra-ICU mortality rate was lower in CAGTA-positive patients [19,20].

In future studies, the role of CAGTA in patients with deep-seated candidiasis without candidemia needs to be established, as well as its performance in immunosuppressed patients in whom we observed a higher rate of false-negative results.

Our study has limitations that might have effected the results and their interpretations. First, it is a retrospective analysis in which blood for CAGTA was analyzed only once, so the test could not be evaluated for disease screening or therapy response. Second, we were able to study only a relatively small number of cases. However, to the best of our knowledge, this is the first time that serum CAGTA determinations were used to discriminate the extent of tissue infection in patients with candidemia.

We conclude that the presence of a positive CAGTA test in a patient with candidemia is an indication that the patient has deep-seated candidiasis. Under these circumstances, extension screening studies should be performed and origins other than catheters should be searched. Prospective studies that include a larger number of patients, serial samples, and combination of different nonculture techniques are needed in order to determine the clinical implications of this finding and its potential utility in defining the optimal duration of therapy.

## Acknowledgments

CAGTA kits were kindly provided by Dr. Joaquín Mendoza, head of Vircell, S.L. (Vircell Microbiologist S.L., Granada, Spain). This work was supported by grants from Fondo de Investigación Sanitaria (grants PI11/00167 and PI10/02868). J. G. (Miguel Servet program reference MS09/00055) and P. E. (Sara Borrell program reference CD09/00230) are supported by the Fondo de Investigación Sanitaria. M. d. C. M. is supported by Fundación para la Investigación Biomédica del Hospital Gregorio Marañón. The Fundación para la Investigación Biomédica del Hospital Gregorio Marañón (FIBHGM) was the study promoter (ref. EONC001-2012).

## Declaration of interest

The authors report no conflicts of interest. The authors alone are responsible for the content and the writing of the paper.

## References

1. Clancy CJ, Nguyen MH. Finding the “missing 50%” of invasive candidiasis: how nonculture diagnostics will improve understanding of disease spectrum and transform patient care. *Clin Infect Dis* 2013; **56**: 1284–1292.
2. Nguyen MH, Wissel MC, Shields RK et al. Performance of *Candida* real-time polymerase chain reaction, beta-D-glucan assay, and blood cultures in the diagnosis of invasive candidiasis. *Clin Infect Dis* 2012; **54**: 1240–1248.
3. Moragues MD, Ortiz N, Iruretagoyena JR et al. Evaluation of a new commercial test (*Candida albicans* IFA IgG) for the serodiagnosis of invasive candidiasis. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2004; **22**: 83–88 [in Spanish].
4. Linares MJ, Javier MR, Villanueva JL et al. Detection of antibodies to *Candida albicans* germ tubes in heroin addicts with systemic candidiasis. *Clin Microbiol Infect* 2001; **7**: 218–226.
5. García-Ruiz JC, Arilla MC, Regúlez P et al. Detection of antibodies to *Candida albicans* germ tubes for diagnosis and therapeutic monitoring of invasive candidiasis in patients with hematologic malignancies. *J Clin Microbiol* 1997; **35**: 3284–3287.
6. Pemán J, Zaragoza R, Quindós G et al. Clinical factors associated with a *Candida albicans* germ tube antibody positive test in intensive care unit patients. *BMC Infect Dis* 2011; **11**: 60.
7. Laín A, Elguezal N, Brena S et al. Diagnosis of invasive candidiasis by enzyme-linked immunosorbent assay using the N-terminal fragment of *Candida albicans* hyphal wall protein 1. *BMC Microbiol* 2007; **7**: 35.
8. Brand A. Hyphal growth in human fungal pathogens and its role in virulence. *Int J Microbiol* 2012; **2012**: 517–529.
9. Mayer FL, Wilson D, Hube B. *Candida albicans* pathogenicity mechanisms. *Virulence* 2013; **4**: 119–128.
10. Saville SP, Lazzell AL, Monteagudo C, Lopez-Ribot JL. Engineered control of cell morphology in vivo reveals distinct roles for yeast and filamentous forms of *Candida albicans* during infection. *Eukaryot Cell* 2003; **2**: 1053–1060.
11. Cuenca-Estrella M. Laboratory diagnosis of fungal infection diseases. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2012; **30**: 257–264 [in Spanish].
12. Leroy O, Gangneux JP, Montravers P et al. Epidemiology, management, and risk factors for death of invasive *Candida* infections in critical care: a multicenter, prospective, observational study in France (2005–2006). *Crit Care Med* 2009; **37**: 1612–1618.
13. Girmenia C, Martino P, De Bernardis F, Cassone A. Assessment of detection of *Candida* mannoproteinemia as a method to differentiate central venous catheter-related candidemia from invasive disease. *J Clin Microbiol* 1997; **35**: 903–906.
14. Ponton J, Jones JM. Analysis of cell wall extracts of *Candida albicans* by sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis and Western blot techniques. *Infect Immun* 1986; **53**: 565–572.
15. Heintz-Buschart A, Eickhoff H, Hohn E, Bilitewski U. Identification of inhibitors of yeast-to-hyphae transition in *Candida albicans* by a reporter screening assay. *J Biotechnol* 2013; **164**: 137–142.
16. Ponton J, del Palacio A. Advances and limitations in the early diagnosis of invasive yeast infections. *Rev Iberoam Micol* 2007; **24**: 181–186 [in Spanish].
17. Ponton J, Quindós G, Arilla MC, Mackenzie DW. Simplified adsorption method for detection of antibodies to *Candida albicans* germ tubes. *J Clin Microbiol* 1994; **32**: 217–219.
18. Brunke S, Hube H. Two unlike cousins: *Candida albicans* and *C. glabrata* infection strategies. *Cell Microbiol* 2013; **15**: 701–708.
19. Zaragoza R, Pemán J, Quindós G et al. Kinetic patterns of *Candida albicans* germ tube antibody in critically ill patients: influence on mortality. *Clin Vaccine Immunol* 2009; **16**: 1527–1528.
20. Pemán J, Zaragoza R. Towards an early diagnosis of invasive candidiasis in the critically ill patient. *Rev Iberoam Micol* 2012; **29**: 71–75.

## Candida biomarkers in patients with candidaemia and bacteraemia

M. Carmen Martínez-Jiménez<sup>1,2</sup>, Patricia Muñoz<sup>1-4\*</sup>, Maricela Valerio<sup>1,2</sup>, Roberto Alonso<sup>1,2</sup>, Carmen Martos<sup>1</sup>, Jesús Guinea<sup>1-3</sup> and Emilio Bouza<sup>1-4</sup>

<sup>1</sup>Clinical Microbiology and Infectious Disease Department, Hospital General Universitario Gregorio Marañón, Madrid, Spain; <sup>2</sup>Instituto de Investigación Sanitaria del Hospital Gregorio Marañón, Madrid, Spain; <sup>3</sup>CIBER Enfermedades Respiratorias—CIBERES (CB06/06/0058), Madrid, Spain; <sup>4</sup>Medicine Department, School of Medicine, Universidad Complutense de Madrid, Madrid, Spain

\*Corresponding author. Servicio de Microbiología Clínica y Enfermedades Infecciosas, Hospital General Universitario Gregorio Marañón, C/ Dr. Esquerdo, 46, 28007 Madrid, Spain. Tel: +34-91-586-71-63; Fax: +34-91-504-49-06; E-mail: pmunoz@micro.hggm.es

Received 30 September 2014; returned 28 November 2014; revised 5 February 2015; accepted 18 March 2015

**Objectives:** Microbiological strategies are necessary to help clinicians discontinue empirical antifungal therapy in patients with suspected invasive candidiasis. Culture methods and biomarkers each show low sensitivity. We analysed the value of combining different biomarkers as a decision-making tool for discontinuing empirical antifungal treatment.

**Methods:** We studied stored serum samples from 31 patients with candidaemia (*Candida albicans* 40%, *Candida tropicalis* 20%, *Candida parapsilosis* 18%, *Candida glabrata* 12% and other 10%) and 50 patients with bacteraemia at Gregorio Marañón Hospital, Madrid, Spain. *C. albicans* germ tube antibody (CAGTA), mannan antigens (MN), antimannan antibodies (AMN) and (1→3)-β-D-glucan (BDG) were assayed using the manufacturer's and alternative cut-offs to improve the accuracy of the tests.

**Results:** The sensitivity of the biomarkers when used alone was low (58%–84%), but specificity was high (65.8%–92.0%). The best combinations were CAGTA and BDG using cut-offs of 1/80 and 80 pg/mL, respectively (sensitivity 96.8% and specificity 84%), and CAGTA and MN using cut-offs of 1/80 and 75 pg/mL, respectively (sensitivity 93.5% and specificity 86.0%). The sensitivity of both combinations was 100% for *C. albicans*, *C. tropicalis* and *C. parapsilosis*, but only combinations including BDG detected *Candida krusei*. The negative predictive values (NPVs) of both combinations were, respectively, 97.7% and 95.6% (prevalence of candidaemia, 23.6%). For a prevalence of candidaemia of 5% and 10%, the NPV reached 99.8% and 99.6%.

**Conclusions:** The combinations of CAGTA and BDG or CAGTA and MN had a very high NPV at the alternative cut-offs and could be used in antifungal stewardship programmes as a decision-making tool for discontinuing unnecessary empirical therapy in patients with suspected candidaemia.

**Keywords:** stop, unnecessary antifungals, diagnosis, antifungal therapy

### Introduction

Early empirical treatment of suspected invasive candidiasis (IC) significantly affects survival<sup>1</sup> and now constitutes one-third of antifungal prescriptions in many institutions.<sup>2,3</sup> Selection of patients for empirical antifungal therapy is based mainly on clinical prediction scores, which are designed for non-neutropenic, critically ill patients.<sup>4</sup> However, given the low positive predictive value (PPV) of these scores, many patients may receive unnecessary, expensive and sometimes toxic antifungals.

Only half of patients with IC have positive blood cultures,<sup>5</sup> and the microbiological diagnosis is usually confirmed 2–5 days after collection of the blood sample.<sup>6</sup> New non-culture-based

diagnostic biomarkers for IC include the *Candida albicans* germ tube antibody (CAGTA), Platelia *Candida* mannan antigens (MN) and antimannan antibodies (AMN) and (1→3)-β-D-glucan (BDG). These methods have usually been evaluated as single tests in selected populations for diagnosis of IC;<sup>7–10</sup> however, the diagnostic power of combining the four biomarkers and the analysis of different cut-offs could enable unnecessary antifungal treatment to be discontinued safely. The combination of diagnostic biomarkers has not been studied in IC.

We analysed the yield of four marketed *Candida* biomarkers to rule out the presence of candidaemia in a non-selected cohort of patients with candidaemia and bacteraemia. We also proposed alternative cut-offs to improve the accuracy of these procedures for the different *Candida* species.



## Methods

### Hospital description

Hospital Gregorio Marañón serves a population of ~715 000 inhabitants in Madrid, Spain and cares for patients at high risk of candidaemia (e.g. medical and surgical ICU patients, neonates, patients with haematological malignancies, solid organ recipients and patients with central venous catheters).

### Patients included and samples studied

We studied serum samples from adult patients with candidaemia ( $n=31$ ) and patients with bacteraemia ( $n=50$ ). Serum samples to perform biomarkers were extracted from a peripheral vein within 48 h of the extraction of the positive blood culture. One serum sample per patient was used to study the presence of CAGTA, MN, AMN and BDG. Candidaemia was caused by *C. albicans* ( $n=12$ ), *Candida tropicalis* ( $n=7$ ), *Candida parapsilosis* ( $n=6$ ), *Candida glabrata* ( $n=4$ ), *Candida krusei* ( $n=1$ ) and *C. albicans*+*C. glabrata* ( $n=1$ ). The aetiology of bloodstream infection in patients with bacteraemia used as controls is shown in Table 1 (28 Gram-negative and 22 Gram-positive). *Candida* was identified using the standard method (ID 32C, bioMérieux, Marcy-l'Étoile, France).

Serum samples were stored at  $-70^{\circ}\text{C}$  until processing. None underwent more than one freeze–thaw cycle, and serum and reagents were tempered and homogenized before processing.

### Definitions

In patients with specific signs and symptoms of sepsis, candidaemia was defined as the isolation of *Candida* spp. in  $\geq 1$  blood culture from a peripheral vein<sup>11</sup> and bacteraemia was defined as the isolation of  $\geq 1$  bacterial species in blood cultures.

### Serological detection of biomarkers

For CAGTA (Vircell Microbiologist S.L., Granada, Spain),  $\geq 1/160$  was the cut-off for positivity. For MN and AMN, Platelia *Candida* Ag Plus and Platelia *Candida* Ab Plus were used in the automated EVOLIS™ Twin Plus device (Bio-Rad, Marnes-la-Coquette, France). The manufacturer's cut-offs were as follows: MN, positive  $\geq 125$  pg/mL, indeterminate  $<125$ – $62.5$  pg/mL and negative  $<62.5$  pg/mL; AMN, positive  $\geq 10$  AU/mL, indeterminate  $<10$ – $5$  AU/mL and negative  $<5$  AU/mL. BDG was studied using Fungitell® and the plates were colorimetrically read (ELX808™ Micro-plate and GEN5 Software, BIORAD U.S., Vermont, USA); the manufacturer's cut-offs for BDG were as follows: positive  $\geq 80$  pg/mL, indeterminate  $\geq 62$  to  $<80$  pg/mL and negative  $<62$  pg/mL.

### Data analysis

Clinical data were collected after reviewing the clinical charts according to a pre-established protocol. Demographic information and the presence of underlying conditions were recorded. Serology was considered positive if  $\geq 1$  of the biomarkers (CAGTA, MN, AMN or BDG) had a result above the manufacturer's cut-offs. The epidemiological and clinical characteristics of patients with candidaemia and bacteraemia were compared. We used the two-tailed Fisher's exact test to study the correlation between CAGTA, MN, AMN and BDG in the two groups of patients. The sensitivity, specificity and accuracy of the tests were obtained. Normally distributed values were expressed as the mean and standard deviation. A  $P$  value  $<0.05$  was considered statistically significant.

In order to improve accuracy, receiver operating characteristic (ROC) curves were plotted and the points on the curve reviewed according to their sensitivity and specificity. The optimal cut-offs according to the best

pair of sensitivity and specificity were selected. The alternative cut-offs studied were 1/80 (CAGTA80), MN 125 pg/mL and 75 pg/mL (MN125 and MN75), AMN 10 AU/mL (AMN10) and BDG 80 pg/mL (BDG80). The ROC curves were constructed for each biomarker alone and also for all possible combinations (with a CI of 95%) for comparisons of the AUC. Logistic regression was used to verify optimization of the combined biomarkers in the diagnosis of IC.

We calculated the PPV and negative predictive value (NPV) for the prevalence of candidaemia in our study (23.6%) and for prevalences of 5% and 10%.

Data were entered into Access 2007, and SPSS 20.0 (IBM SPSS Statistics for Windows, IBM Corp., Armonk, New York, USA) was used for the statistical analysis.

### Ethics approval and patient consent/privacy

The study was approved by the local ethics committee (CEIC-A1, ref. 350/12) and the relevant Spanish authorities [Agencia Española del Medicamento y Productos Sanitarios, AEMPS (Spanish Agency for Medicines and Health Care Products)]. The use of stored sera was authorized with a waiver of informed consent by the ethics committee.

## Results

### Patient characteristics

Demographic characteristics are shown in Table 1. Patients with candidaemia were more frequently admitted to surgical wards (48.4% versus 20%;  $P<0.05$ ) and had a longer hospital stay before the positive blood culture than patients with bacteraemia (17 versus 4 days;  $P<0.05$ ). Traditional risk factors for *Candida* infection (e.g. intravenous catheter, total parenteral nutrition, mechanical ventilation, abdominal surgery, antimicrobial use and previous *Candida* spp. colonization) were significantly more common in the candidaemia group (Table 1). The source of bloodstream infection was more often catheter-related in patients with candidaemia than in patients with bacteraemia (38.7% versus 8%;  $P<0.05$ ). Mortality was also significantly higher in patients with candidaemia than in patients with bacteraemia (Table 1).

### Results of CAGTA, MN, AMN and BDG individually

The sensitivity, specificity, PPV, NPV and accuracy of CAGTA, MN, AMN and BDG alone for the diagnosis of candidaemia are shown in Table 2. The sensitivity of all biomarkers alone ranged from 58.1% (CAGTA) to 83.9% (BDG) and the specificity from 65.8% (AMN) to 95.7% (MN).

False-positive and -negative results were detected (Table 2). In patients with candidaemia, sensitivity was 83.9% for BDG, 58.1% for CAGTA and MN, and 51.6% for AMN. The frequency of indeterminate results was 9.7% for MN and 16% for AMN.

In patients with bacteraemia, the rate of false positives was 6% for CAGTA and MN, 8% for BDG and 26% for AMN. The aetiology of the bacteraemia that generated false positives was as follows: CAGTA, *Staphylococcus epidermidis* ( $n=3$ ); MN, *Acinetobacter baumannii* ( $n=2$ ) and *Serratia marcescens* ( $n=1$ ); and BDG, *Staphylococcus aureus* ( $n=2$ ), *Klebsiella pneumoniae* ( $n=1$ ) and *Enterococcus faecalis* ( $n=1$ ) for BDG. AMN also had a high percentage of indeterminate results in bacteraemic patients (24%). Interestingly, all patients with *Pseudomonas aeruginosa* bacteraemia ( $n=4$ ) had a false-positive AMN; none was colonized by *Candida*.

**Table 1.** Comparison of the characteristics of 31 patients with candidaemia and 50 patients with bacteraemia

	Candidaemia (n=31)	Bacteraemia <sup>a</sup> (n=50)	P
Male, n (%)	14 (45.2)	34 (68)	0.042
Age (years), mean $\pm$ SD	66.4 $\pm$ 14.7	65.6 $\pm$ 17.3	—
Ward of admission, n (%)			
surgical	15 (48.4)	10 (20)	0.007
medical	10 (32.3)	34 (68)	0.002
onco-haematology	4 (12.9)	2 (4)	0.131
intensive care	2 (6.5)	4 (8)	0.796
Underlying condition, n (%)			
gastrointestinal disease	18 (58.1)	21 (42)	0.160
solid tumour	16 (51.6)	15 (30)	0.052
liver disease	6 (19.4)	14 (28)	0.380
genito-urinary disease	7 (22.6)	16 (32)	0.361
cardiovascular disease	6 (19.4)	13 (26)	0.493
renal insufficiency	6 (19.4)	10 (20)	0.943
diabetes	6 (19.4)	10 (20)	0.943
haematological disease	2 (6.5)	2 (4)	0.621
lung disease	3 (9.7)	6 (12)	0.746
solid organ transplantation	0 (0)	5 (10)	0.069
Hospital days until candidaemia, median $\pm$ SD	17 $\pm$ 59.8	4.1 $\pm$ 8.2	—
Risk factors for candidiasis, n (%)			
intravenous catheter	29 (93.5)	20 (40)	<0.001
surgery	17 (54.8)	15 (30)	0.026
indwelling bladder catheter	12 (38.7)	15 (30)	0.419
total parenteral nutrition	15 (48.4)	3 (6)	<0.001
mechanical ventilation	7 (22.6)	3 (6)	0.027
abdominal surgery	12 (38.7)	7 (14)	0.011
immunosuppression	3 (9.7)	9 (18)	0.305
haemodialysis	4 (12.9)	3 (6)	0.282
broad-spectrum antibiotic	31 (100)	11 (22)	<0.001
antifungal prophylaxis	5 (16.1)	5 (10)	0.415
colonization/infection by <i>Candida</i> spp.	31 (100)	11 (22)	<0.001
Source of bloodstream infection, n (%)			
catheter	12 (38.7)	4 (8)	0.001
primary	3 (9.7)	3 (6)	0.539
urine	4 (12.9)	14 (28)	0.112
intra-abdominal	10 (32.3)	16 (32)	0.981
respiratory tract	1 (3.2)	6 (12)	0.172
endocarditis/endovascular infection	0 (0)	2 (4)	0.260
skin or soft tissue infections <sup>b</sup>	0 (0)	5 (10)	0.069
CNS	1 (3.2)	0 (0)	0.201
Overall mortality, n (%)	11 (35.5)	1 (2)	<0.001
Related mortality (0–7 days), n (%)	5 (16.1)	0 (0)	0.003

<sup>a</sup>A. baumannii (n=2), Escherichia coli (n=9), E. coli + Enterococcus faecium (n=1), E. coli + E. faecalis (n=1), E. faecium (n=1), E. faecalis (n=4), Enterobacter aerogenes (n=1), Enterobacter cloacae (n=1), Haemophilus influenzae (n=1), K. pneumoniae (n=2), K. pneumoniae + E. coli (n=1), Moraxella catarrhalis (n=1), Proteus mirabilis (n=1), P. aeruginosa (n=4), Salmonella enteritidis (n=2), S. aureus (n=7), coagulase-negative Staphylococcus (n=1), S. marcescens (n=1), S. epidermidis (n=3), Streptococcus bovis (n=2), Streptococcus pneumoniae (n=3) and Streptococcus viridans (n=1).

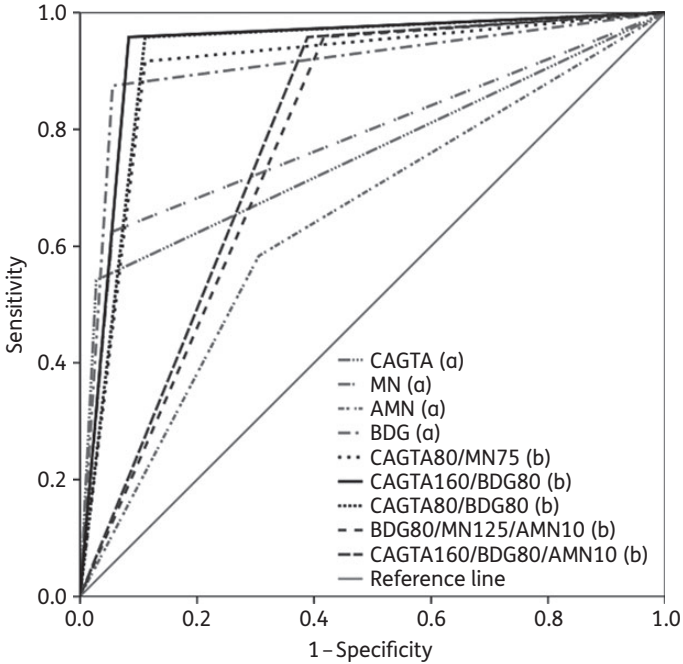
<sup>b</sup>Skin or soft tissue infections (n=2), wound infection (n=1) and septic arthritis (n=2).

**Table 2.** Results of CAGTA, MN, AMN and BDG used alone in patients with candidaemia and bacteraemia; manufacturer's and alternative cut-offs are shown

Biomarker results alone and combined	Result	Candidaemia (n=31)	Bacteraemia (n=50)	Sensitivity, % (95% CI)	Specificity, % (95% CI)	PPV <sup>a</sup> , % (95% CI)	NPV <sup>a</sup> , % (95% CI)	Accuracy, % (95% CI)
Manufacturer's cut-off								
CAGTA	positive	18 (58.1%)	3 (6.0%)	58.1 (39.3–74.9)	92.0 (79.9–97.4)	81.8 (59.0–94.0)	78.0 (64.9–87.3)	79.0 (68.3–87.0)
	negative	13 (41.9%)	47 (94.0%)					
MN	positive	18 (58.1%)	2 (4.0%)	64.3 (44.1–80.7)	95.7 (84.3–99.3)	90.0 (66.9–98.2)	81.8 (68.6–90.5)	84.0 (73.3–91.1)
	indeterminate	3 (9.7%)	3 (6.0%)					
AMN	negative	10 (32.3%)	45 (90.0%)					
	positive	16 (51.6%)	13 (26.0%)	61.5 (40.7–79.1)	65.8 (48.6–79.9)	55.2 (36.0–73.0)	71.4 (53.5–84.8)	64.1 (51.0–75.4)
	indeterminate	5 (16.1%)	12 (24.0%)					
	negative	10 (32.3%)	25 (50.0%)					
BDG	positive	26 (83.9%)	4 (8.0%)	83.9 (65.5–93.9)	91.8 (79.5–97.3)	86.7 (68.4–95.6)	90.0 (77.4–96.3)	88.7 (79.2–94.4)
	indeterminate	0	1 (2.0%)					
	negative	5 (16.1%)	45 (90.0%)					
	positive	25 (80.6%)	15 (30.0%)	86.2 (67.4–95.5)	60.5 (43.4–75.5)	62.5 (45.8–76.8)	85.2 (65.4–95.1)	71.6 (59.1–81.7)
MN/AMN	indeterminate	2 (6.5%)	12 (24.0%)					
	negative	4 (12.9%)	23 (46.0%)					
CAGTA/BDG	positive	29 (93.5%)	6 (12.0%)	93.5 (77.2–98.9)	88.0 (75.0–95.0)	82.9 (65.7–92.8)	95.6 (84.0–99.2)	90.1 (80.9–95.3)
	indeterminate	0	0					
	negative	2 (6.5%)	44 (88.0%)					
	positive	29 (93.5%)	17 (34.0%)	96.7 (80.9–99.8)	59.0 (42.2–74.0)	64.4 (48.7–77.7)	95.8 (76.9–99.8)	75.4 (63.3–84.6)
BDG/AMN	indeterminate	1 (3.2%)	10 (20.0%)					
	negative	1 (3.2%)	23 (46.0%)					
CAGTA/MN/AMN/BDG	positive	30 (96.8%)	21 (42.0%)	96.7 (81.5–99.8)	48.8 (33.1–64.6)	58.8 (44.2–72.1)	95.2 (74.1–99.7)	69.4 (57.3–79.5)
	indeterminate	0	9 (18.0%)					
	negative	1 (3.2%)	20 (40.0%)					
Alternative cut-off								
CAGTA80	Positive	21 (67.7%)	5 (10.0%)	67.7 (48.5–82.7)	90.0 (77.4–96.3)	80.8 (60.0–92.7)	81.8 (68.6–90.5)	81.5 (71.0–88.9)
	negative	10 (32.3%)	45 (90.0%)					
MN75	positive	20 (64.5%)	3 (6.0%)	64.5 (45.4–80.2)	94.0 (82.5–98.4)	87.0 (65.3–96.6)	81.0 (68.2–89.7)	82.7 (72.4–89.9)
	negative	11 (35.5%)	47 (94.0%)					
MN125	positive	18 (58.1%)	2 (4.0%)	58.1 (39.3–74.9)	96.0 (85.1–99.3)	90.0 (66.9–98.2)	78.7 (66.0–87.7)	81.5 (71.0–88.9)
	negative	13 (41.9%)	48 (96.0%)					
AMN10	positive	16 (51.6%)	13 (26.0%)	51.6 (33.4–69.4)	74.0 (59.4–84.9)	55.2 (36.0–73.0)	71.1 (56.7–82.4)	65.4 (54.0–75.4)
	negative	15 (48.4%)	37 (74.0%)					
BDG80	positive	26 (83.9%)	4 (8.0%)	83.9 (65.5–93.9)	92.0 (79.9–97.4)	86.7 (68.4–95.6)	90.2 (77.8–96.3)	88.9 (79.5–94.5)
	negative	5 (16.1%)	46 (92.0%)					
MN125/AMN10	positive	25 (80.6%)	15 (30.0%)	80.6 (61.9–91.9)	70.0 (55.2–81.7)	62.5 (45.8–76.8)	85.4 (70.1–93.9)	74.1 (62.9–82.9)
	negative	6 (19.4%)	35 (70.0%)					

CAGTA80/BDG80	positive	30 (96.8%)	8 (16.0%)	96.8 (81.5–99.8)	84.0 (70.3–92.4)	78.9 (62.2–89.9)	97.7 (86.2–99.9)	88.9 (79.5–94.5)
	negative	1 (3.2%)	42 (84.0%)					
CAGTA80/MN75	positive	29 (93.5%)	7 (14.0%)	93.5 (77.2–98.9)	86.0 (72.6–93.7)	80.6 (63.4–91.2)	95.6 (83.6–99.2)	88.9 (79.5–94.5)
	negative	2 (6.5%)	43 (86.0%)					
CAGTA160/BDG80	positive	29 (93.5%)	6 (12.0%)	93.5 (77.2–98.9)	88.0 (75.0–95.0)	82.9 (65.7–92.8)	95.6 (84.0–99.2)	90.1 (80.9–95.3)
	negative	2 (6.5%)	44 (88.0%)					
BDG80/MN125/AMN10	positive	29 (93.5%)	19 (38.0%)	93.5 (77.2–98.9)	62.0 (47.2–75.0)	60.4 (45.3–73.9)	93.9 (78.4–98.9)	74.1 (62.9–82.9)
	negative	2 (6.5%)	31 (62.0%)					
CAGTA160/BDG80/AMN10	positive	30 (96.8%)	18 (36.0%)	96.8 (81.5–99.8)	64.0 (49.1–76.7)	62.5 (47.3–75.7)	97.0 (82.5–99.8)	76.5 (65.6–84.9)
	negative							

<sup>a</sup>Predictive values for prevalence of this study (23.6%).  
Manufacturer's cut-offs: CAGTA, positive  $\geq 1/160$  and negative  $< 1/160$ ; MN, positive  $\geq 125$  pg/mL and negative  $< 62.5$  pg/mL; AMN, positive  $\geq 10$  AU/mL, indeterminate  $< 10 - 5$  AU/mL and negative  $< 5$  AU/mL; BDG, positive  $\geq 80$  pg/mL, indeterminate  $\geq 62$  to  $< 80$  pg/mL and negative  $< 62$  pg/mL. Indeterminate results were not considered for the statistical analysis.  
Alternative cut-offs: CAGTA80, positive  $\geq 1/80$  and negative  $< 1/80$ ; MN75, positive  $\geq 75$  pg/mL and negative  $< 75$  pg/mL; MN125, positive  $\geq 125$  pg/mL and negative  $< 125$  pg/mL; AMN10, positive  $\geq 10$  AU/mL and negative  $< 10$  AU/mL; BDG80, positive  $\geq 80$  pg/mL and negative  $< 80$  pg/mL.  
Combined biomarkers: we considered a result to be positive if at least one of the biomarkers was positive.



**Figure 1.** ROC curves showing the different combinations of biomarkers with the different cut-offs studied. The best sensitivity and specificity for the diagnosis of candidaemia were observed with CAGTA80/BDG80, CAGTA80/MN75, CAGTA160/BDG80, BDG80/MN125/AMN10 and CAGTA160/BDG80/AMN10. (a) Manufacturer's cut-offs. (b) The best alternative cut-off. AUC of biomarkers alone and combined (95% CI) were as follows: CAGTA, 0.757 (0.621–0.893); MN, 0.785 (0.655–0.915); AMN, 0.639 (0.494–0.784); BDG, 0.910 (0.821–0.999); CAGTA80/MN75, 0.903 (0.815–0.991); CAGTA160/BDG80, 0.938 (0.867–1.000); CAGTA80/BDG80, 0.924 (0.847–1.000); BDG80/MN125/AMN10, 0.771 (0.652–0.890); and CAGTA160/BDG80/AMN10, 0.785 (0.668–0.901).

Alternative cut-offs did not improve the accuracy of the tests when used alone (Table 2). However, in the case of MN, AMN and BDG, alternative cut-offs led the indeterminate results to be classified as positive or negative.

**Results of CAGTA, MN, AMN and BDG used in combination**

All possible combinations of the four biomarkers were analysed with alternative cut-offs (Table 2 and Figure 1). Logistic regression analysis revealed that not all biomarkers should be combined for diagnosis of IC. When three biomarkers were used together, the best combinations were CAGTA160/BDG80/AMN10 (sensitivity 96.8% and specificity 64.0%) and BDG80/MN125/AMN10 (sensitivity 93.5% and specificity 62.0%). However, the combination of two biomarkers showed better accuracy: CAGTA80/BDG80 (sensitivity 96.8% and specificity 84.0%), CAGTA160/BDG80 (sensitivity 93.5% and specificity 88.0%) and CAGTA80/MN75 (sensitivity 93.5% and specificity 86.0%). The highest NPV was obtained with the combination CAGTA80/BDG80, which was the best for ruling out candidaemia. Although the difference with BDG80 did not reach statistical significance, the combination increased the NPV from 90.2% to 97.7%.

As shown in Figure 1, the combinations CAGTA80/BDG80 and CAGTA80/MN75 yielded AUCs in the ROC curve of 0.924 and



**Table 3.** Sensitivity of biomarkers according to the species of *Candida* causing candidaemia; the combination was considered positive if at least one of the biomarkers was positive

<i>Candida</i> spp. (31)	CAGTA <sup>a</sup>	MN <sup>a</sup>	AMN <sup>a</sup>	BDG <sup>a</sup>	CAGTA80/ BDG80 <sup>b</sup>	CAGTA80/ MN75 <sup>b</sup>	CAGTA160/ BDG80 <sup>b</sup>	BDG80/MN125/ AMN10 <sup>b</sup>	CAGTA160/ BDG80/AMN10 <sup>b</sup>
<i>C. albicans</i> (12)	10 (83.3%)	8 (66.7%)	7 (58.3%)	8 (66.7%)	12 (100.0%)	12 (100.0%)	12 (100.0%)	11 (91.7%)	12 (100.0%)
<i>C. tropicalis</i> (7)	2 (28.6%)	6 (85.7%)	2 (28.6%)	7 (100.0%)	7 (100.0%)	7 (100.0%)	7 (100.0%)	7 (100.0%)	7 (100.0%)
<i>C. parapsilosis</i> (6)	3 (50.0%)	2 (33.3%)	4 (66.7%)	5 (83.3%)	6 (100.0%)	6 (100.0%)	5 (83.3%)	6 (100.0%)	5 (83.3%)
<i>C. glabrata</i> (4)	3 (75.0%)	1 (25.0%)	3 (75.0%)	3 (75.0%)	3 (75.0%)	3 (75.0%)	3 (75.0%)	3 (75.0%)	3 (75.0%)
<i>C. krusei</i> (1)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	1 (100.0%)	1 (100.0%)	0 (0.0%)	1 (100.0%)	1 (100.0%)	1 (100.0%)
<i>C. albicans</i> + <i>C. glabrata</i> (1)	0 (0.0%)	1 (100.0%)	0 (0.0%)	1 (100.0%)	1 (100.0%)	1 (100.0%)	1 (100.0%)	1 (100.0%)	1 (100.0%)

Indeterminate results were considered as non-detected (MN, 1 *C. tropicalis*, 1 *C. parapsilosis* and 1 *C. glabrata*; AMN, 3 *C. albicans* and 2 *C. tropicalis*; BDG, 1 *C. glabrata*).

<sup>a</sup>Following the manufacturer's cut-offs.

<sup>b</sup>Alternative cut-off.

0.903, respectively. However, CAGTA160/BDG80 yielded a slightly higher AUC (0.938) and its sensitivity was lower than that of CAGTA80/BDG80 (93.5% versus 96.8%).

### Effect of *Candida* species causing the infection on biomarker results

Table 3 shows the sensitivity of the different biomarkers, alone and in combination, according to the *Candida* species causing fungaemia. The combinations of CAGTA80/BDG80 and CAGTA80/MN75 showed a sensitivity of 100% for *C. albicans*, *C. tropicalis* and *C. parapsilosis*. Candidaemia caused by *C. krusei* was only detected when BDG was included.

### PPV and NPV depending on the prevalence of candidaemia

The PPV and NPV of the biomarkers, alone and combined, were calculated for different prevalence values (Table 4). For the prevalence of candidaemia found in our study (23.6%), the PPV and NPV were 78.9% and 97.7% for CAGTA80/BDG80 and 80.6% and 95.6% for CAGTA80/MN75. For a lower prevalence of candidaemia (5% and 10%), the NPV were as follows: CAGTA80/BDG80, 99.8% and 99.6%, respectively; and CAGTA80/MN75, 99.6% and 99.2%, respectively.

## Discussion

Our findings suggest that the combination of CAGTA and BDG or CAGTA and MN has a very high NPV (>99%), thus enabling candidaemia to be excluded in high-risk patients and antifungal stewardship policies to be directed towards early discontinuation of unnecessary empirical antifungal drugs. The alternative cut-offs for CAGTA and BDG and for CAGTA and MN significantly increased the sensitivity and specificity of the tests and helped in the interpretation of indeterminate results.

Suspicion of IC is based on clinical scores that show high sensitivity but low specificity.<sup>4</sup> Since many patients with IC do not have candidaemia, antifungal treatment is overused and could be decreased with the help of highly specific and sensitive

**Table 4.** PPV and NPV for different prevalence values

Biomarker	Prevalence					
	23.6% <sup>c</sup>		10%		5%	
	PPV (%)	NPV (%)	PPV (%)	NPV (%)	PPV (%)	NPV (%)
CAGTA <sup>a</sup>	81.8	78.0	44.6	95.2	27.6	97.6
MN <sup>a</sup>	90.0	81.8	62.4	96.0	44.0	98.1
AMN <sup>a</sup>	55.2	71.4	16.6	93.9	8.6	97.0
BDG <sup>a</sup>	86.7	90.0	53.2	98.1	35.0	99.1
CAGTA160 <sup>b</sup>	81.8	78.0	44.6	95.2	27.6	97.6
CAGTA80 <sup>b</sup>	80.8	81.8	42.9	96.2	26.3	98.1
BDG80 <sup>b</sup>	86.7	90.2	53.8	98.1	35.6	99.1
MN125 <sup>b</sup>	90.0	78.7	61.7	95.4	43.3	97.7
MN75 <sup>b</sup>	87.0	81.0	54.4	96.0	36.2	98.0
AMN10 <sup>b</sup>	55.2	71.1	18.1	93.2	9.4	96.7
MN125/AMN10 <sup>b</sup>	62.5 <sup>d</sup>	85.4	23.0	97.0	12.4	98.6
BDG80/MN125/AMN10 <sup>b</sup>	60.4 <sup>d</sup>	93.9 <sup>e</sup>	21.5	98.8	11.5	99.4
CAGTA80/MN75 <sup>b</sup>	80.6	95.6 <sup>e</sup>	42.6	99.2	26.0	99.6
CAGTA160/BDG80 <sup>b</sup>	82.9	95.6 <sup>e</sup>	46.4	99.2	29.1	99.6
CAGTA80/BDG80 <sup>b</sup>	78.9	97.7 <sup>e</sup>	40.2	99.6	19.4	99.8

<sup>a</sup>Manufacturer's cut-offs. Indeterminate results were removed from the statistical analysis.

<sup>b</sup>Alternative cut-offs.

<sup>c</sup>Prevalence of this cohort.

<sup>d</sup>P values resulting from comparing PPV between individual and combined biomarkers: BDG80 versus BDG80/MN125/AMN10 and MN125 versus BDG80/MN125/AMN10 and versus MN125/AMN10,  $P < 0.05$ .

<sup>e</sup>P values resulting from comparing NPV between individual and combined biomarkers: CAGTA160 versus CAGTA160/BDG80, CAGTA80 versus CAGTA80/BDG80, MN75 versus CAGTA80/MN75 and AMN10 versus BDG80/MN125/AMN10,  $P < 0.05$ .

diagnostic tools. Therefore, we sought the best combination of biomarkers (at different cut-offs) that would increase the NPV and PPV for candidaemia as much as possible.

BDG, CAGTA and MN provide results in 4 h and are more cost-effective than empirical antifungal treatments. However, guidelines recommend them for diagnosis of candidaemia and not for discontinuation of antifungal treatment.<sup>11–14</sup>

CAGTA detects antimycelium antibodies against the hwp1 antigen, which is only expressed during the invasive stage of *Candida* infection.<sup>7,15</sup> We detected three false-positive results in patients with *S. epidermidis* bacteraemia; the false-negative results were from patients with catheter-related candidaemia (data not shown). CAGTA could be used to determine whether candidaemia originated in the catheter or in deep organs, as previously reported.<sup>16</sup> The limitations of this test, when used alone, have been discussed elsewhere.<sup>17</sup>

The sensitivity and specificity of BDG are moderate to high (56%–93% and 71%–100%, respectively) for the diagnosis of candidaemia and higher than those of the *Candida* score and colonization index.<sup>8,18</sup> Its main limitations are the presence of false positives,<sup>19,20</sup> lack of specificity and high price.<sup>21</sup> In our series, 5/31 (16%) patients with candidaemia had a negative BDG (NPV 90.0%), although our rate of false positives in patients with bacteraemia was low (four patients, 8%). Two of the patients were undergoing renal replacement therapy, the third had received blood products and the fourth had been treated with ceftriaxone. These conditions generate false positives in BDG and should be taken into consideration.<sup>20,22</sup> Another possibility is that some of these patients had occult candidiasis. In fact, one also had a positive CAGTA (1/160) result.

MN and AMN are traditionally used in combination for the detection of mannan antigen in the cell wall of *Candida* spp. (which is released into blood) and also of antimannan antibodies against these antigens.<sup>9,23,24</sup> In our experience, AMN provided no significant benefit in the diagnosis of candidaemia. In fact, when AMN is added to CAGTA/MN or CAGTA/BDG, sensitivity remains unchanged, but specificity decreases because of the high rate of false positives in patients with bacteraemia, as observed elsewhere.<sup>9</sup> In our series, the NPV of MN/AMN ranged from 85.2% to 85.4%, although the technique had disadvantages, such as a high percentage of indeterminate results (16.1% in candidaemia and 22% in bacteraemia) and false-negative results in patients with candidaemia (41.9% MN and 48.3% AMN). The sensitivities for *C. albicans* and *C. tropicalis* were 70% and 100%, respectively, but only 35% for the remaining species ( $P=0.046$ ). The quantity of detectable MN varies with the *Candida* species. The mAbEBCA-1 antibodies used in this technique detect  $\beta$ -(1–5)-oligosaccharides that are not present in all species of *Candida*. The results are especially poor with *C. krusei* and *C. parapsilosis*. Similar data have been reported elsewhere.<sup>9,24–27</sup> Finally, we observed a lack of reproducibility (significant reduction in the titre, even to limits below cut-offs for previously positive samples) when MN findings were retested in frozen serum aliquots (data not shown). This finding is critical and should be further evaluated. For the purposes of this study, following the methodology of previously published articles, we considered the result of the first MN determination to be valid. Finally, it is worth mentioning that, when we analysed the performance of biomarkers in 50 healthy controls (data not shown), AMN was the only test that had false-positive results (8%).

None of the biomarkers used alone was sensitive enough for the detection of invasive *Candida* infection (sensitivity <84%). In contrast, the simultaneous use of several biomarkers improved

sensitivity, without decreasing specificity. The NPV of BDG80 used alone was, however, comparable to that of combined biomarkers, mainly in populations with low prevalence of candidaemia (5%–10%). For populations with higher prevalence of candidaemia, a marginally 7%–10% of NPV was added if CAGTA80 was also incorporated. Although these differences did not reach statistical significance, we believe that the improvement may be clinically relevant when you are using the BMs to stop empirical antifungals in very ill populations. Other authors have already suggested that the use of several biomarkers simultaneously could enhance the diagnostic role of each procedure alone.<sup>25</sup> Some studies have shown that blood cultures and *Candida* PCR, with or without  $\beta$ -D-glucan, improve the detection of IC.<sup>9,28</sup> However, PCR is expensive, time-consuming and not standardized, and the false-positive results of BDG could promote the unnecessary use of antifungal therapy.<sup>29,30</sup>

We believe that the very high NPV of combined BMs for exclusion of IC (CAGTA80/BDG80 97.7%–99%) suggests that they could constitute an objective aid for safely stopping empirical antifungal therapy. This strategy would probably be cost-effective considering the price of the tests (per determination, CAGTA: €10; MN and AMN: €5 each; and BDG: €30) in comparison with the cost of antifungal drugs.

Our study has a series of limitations. First, it was a retrospective study performed in a single centre on heterogeneous populations and the number of candidaemias analysed was low. However, to our knowledge, it is the first to analyse the potential role of combined biomarkers (CAGTA, MN, AMN and BDG) in ruling out candidaemia. Second, since we studied patients with candidaemia as a surrogate marker of IC, the strategy has yet to be proven in patients with other forms of IC.

In conclusion, using the alternative cut-off of CAGTA80/BDG80 or CAGTA80/MN75, we ruled out candidaemia with an NPV >99%. The combination of these biomarkers for the diagnosis of IC could be used as a complementary decision-support tool in antifungal stewardship programmes. Our strategy should be validated in a prospective trial with a more extensive and homogeneous population before its implementation in clinical practice.

## Acknowledgements

This study was partially presented at the Fifty-third Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy, Denver, CO, USA, 2013 (Poster M-1562).

We are grateful to José María Bellón (Fundación para la Investigación Biomédica del Hospital Gregorio Marañón) for assistance with the statistical analysis. We thank Thomas O'Boyle for the language editing of this manuscript prior to submission.

## Funding

This work was supported by grants from Fondo de Investigación Sanitaria (grant numbers PI11/00167 and PI10/02868). M. C. M.-J. is supported by Fundación para la Investigación Biomédica del Hospital Gregorio Marañón. J. G. is supported by a Miguel Servet contract from FIS (MS09/00055). The Fundación para la Investigación Biomédica del Hospital Gregorio Marañón (FIBHGM) was the study promoter (ref. EONC001-2012).

CAGTA kits were kindly provided by Joaquín Mendoza (Head of Vircell, S. L.; Vircell Microbiología S. L., Granada, Spain). The Platelia *Candida* Ag

Plus and Platelia *Candida* Ab Plus assays were provided by Bio-Rad, Marnes-la-Coquette, France.

## Transparency declarations

None to declare.

## References

- Morrell M, Fraser VJ, Kollef MH. Delaying the empiric treatment of *Candida* bloodstream infection until positive blood culture results are obtained: a potential risk factor for hospital mortality. *Antimicrob Agents Chemother* 2005; **49**: 3640–5.
- Valerio M, Rodríguez-González CG, Muñoz P *et al.* Evaluation of antifungal use in a tertiary care institution: antifungal stewardship urgently needed. *J Antimicrob Chemother* 2014; **69**: 1993–9.
- Lopez-Medrano F, San Juan R, Lizasoain M *et al.* A non-compulsory stewardship programme for the management of antifungals in a university-affiliated hospital. *Clin Microbiol Infect* 2013; **19**: 56–61.
- Leon C, Ostrosky-Zeichner L, Schuster M. What's new in the clinical and diagnostic management of invasive candidiasis in critically ill patients. *Intensive Care Med* 2014; **40**: 808–19.
- Clancy CJ, Nguyen MH. Finding the 'missing 50%' of invasive candidiasis: how nonculture diagnostics will improve understanding of disease spectrum and transform patient care. *Clin Infect Dis* 2013; **56**: 1284–92.
- Horvath LL, George BJ, Hospenthal DR. Detection of fifteen species of *Candida* in an automated blood culture system. *J Clin Microbiol* 2007; **45**: 3062–4.
- Mayer FL, Wilson D, Hube B. *Candida albicans* pathogenicity mechanisms. *Virulence* 2013; **4**: 119–28.
- Tissot F, Lamothe F, Hauser PM *et al.*  $\beta$ -glucan antigenemia anticipates diagnosis of blood culture-negative intraabdominal candidiasis. *Am J Respir Crit Care Med* 2013; **188**: 1100–9.
- Held J, Kohlberger I, Rappold E *et al.* Comparison of (1 $\rightarrow$ 3)- $\beta$ -d-glucan, mannan/anti-mannan antibodies, and Cand-Tec *Candida* antigen as serum biomarkers for candidemia. *J Clin Microbiol* 2013; **51**: 1158–64.
- Peman J, Zaragoza R, Quindós G *et al.* Clinical factors associated with a *Candida albicans* germ tube antibody positive test in intensive care unit patients. *BMC Infect Dis* 2011; **11**: 60.
- Cuenca-Estrella M, Verweij PE, Arendrup MC *et al.* ESCMID guideline for the diagnosis and management of *Candida* diseases 2012: diagnostic procedures. *Clin Microbiol Infect* 2012; **18** Suppl 7: 9–18.
- Marchetti O, Lamothe F, Mikulska M *et al.* ECIL recommendations for the use of biological markers for the diagnosis of invasive fungal diseases in leukemic patients and hematopoietic SCT recipients. *Bone Marrow Transplant* 2012; **47**: 846–54.
- Llinares Mondéjar PZCR, Maseda Garrido E, Ferrer Roca R *et al.* EPICO PROJECT. Development of educational recommendations using the DELPHI technique on invasive candidiasis in non- neutropenic critically ill adult patients. *Rev Esp Quimioter* 2013; **26**: 131–50.
- Allothman AF, Al-Musawi T, Al-Abdely HM *et al.* Clinical practice guidelines for the management of invasive *Candida* infections in adults in the Middle East region: expert panel recommendations. *J Infect Public Health* 2014; **7**: 6–19.
- Saville SP, Lazzell AL, Monteagudo C *et al.* Engineered control of cell morphology in vivo reveals distinct roles for yeast and filamentous forms of *Candida albicans* during infection. *Eukaryot Cell* 2003; **2**: 1053–60.
- Martínez-Jiménez MC, Muñoz P, Guinea J *et al.* Potential role of *Candida albicans* germ tube antibody in the diagnosis of deep-seated candidemia. *Med Mycol* 2014; **52**: 270–5.
- Brissaud O, Guichoux J, Harambat J *et al.* Invasive fungal disease in PICU: epidemiology and risk factors. *Ann Intensive Care* 2012; **2**: 6.
- Posteraro B, De Pascale G, Tumbarello M *et al.* Early diagnosis of candidemia in intensive care unit patients with sepsis: a prospective comparison of (1 $\rightarrow$ 3)- $\beta$ -d-glucan assay, *Candida* score, and colonization index. *Crit Care* 2011; **15**: R249.
- Mohr JF, Sims C, Paetznick V *et al.* Prospective survey of (1 $\rightarrow$ 3)- $\beta$ -d-glucan and its relationship to invasive candidiasis in the surgical intensive care unit setting. *J Clin Microbiol* 2011; **49**: 58–61.
- Delaloye J, Calandra T. Invasive candidiasis as a cause of sepsis in the critically ill patient. *Virulence* 2014; **5**: 161–9.
- Sulhian A, Porcher R, Bergeron A *et al.* Use and limits of (1–3)- $\beta$ -d-glucan assay (Fungitell<sup>®</sup>), compared to galactomannan determination (Platelia *Aspergillus*) for diagnosis of invasive aspergillosis. *J Clin Microbiol* 2014; **52**: 2328–33.
- Theel ES, Doern CD.  $\beta$ -d-Glucan testing is important for diagnosis of invasive fungal infections. *J Clin Microbiol* 2013; **51**: 3478–83.
- Prella M, Bille J, Pugnale M *et al.* Early diagnosis of invasive candidiasis with mannan antigenemia and antimannan antibodies. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2005; **51**: 95–101.
- Mikulska M, Calandra T, Sanguinetti M *et al.* The use of mannan antigen and anti-mannan antibodies in the diagnosis of invasive candidiasis: recommendations from the Third European Conference on Infections in Leukemia. *Crit Care* 2010; **14**: R222.
- Morrissey CO. Advancing the field: evidence for new management strategies in invasive fungal infections. *Curr Fungal Infect Rep* 2013; **7**: 51–8.
- Sendid B, Caillot D, Baccouch-Humbert B *et al.* Contribution of the Platelia *Candida*-specific antibody and antigen tests to early diagnosis of systemic *Candida tropicalis* infection in neutropenic adults. *J Clin Microbiol* 2003; **41**: 4551–8.
- Ellis M, Al-Ramadi B, Bernsen R *et al.* Prospective evaluation of mannan and anti-mannan antibodies for diagnosis of invasive *Candida* infections in patients with neutropenic fever. *J Med Microbiol* 2009; **58**: 606–15.
- Nguyen MH, Wissel MC, Shields RK *et al.* Performance of *Candida* real-time polymerase chain reaction,  $\beta$ -d-glucan assay, and blood cultures in the diagnosis of invasive candidiasis. *Clin Infect Dis* 2012; **54**: 1240–8.
- Ayats J, Martín-Mazuelos E, Peman J *et al.* [Spanish Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (SEIMC) guidelines for the diagnosis of invasive fungal infections. 2010 update]. *Enferm Infect Microbiol Clin* 2011; **29**: 39.e1–15.
- Racil Z, Kocmanova I, Lengerova M *et al.* Difficulties in using 1,3- $\beta$ -d-glucan as the screening test for the early diagnosis of invasive fungal infections in patients with haematological malignancies—high frequency of false-positive results and their analysis. *J Med Microbiol* 2010; **59**: 1016–22.

# Combination of *Candida* biomarkers in patients receiving empirical antifungal therapy in a Spanish tertiary hospital: a potential role in reducing the duration of treatment

M. Carmen Martínez-Jiménez<sup>1,2</sup>, Patricia Muñoz<sup>1-4\*</sup>, Maricela Valerio<sup>1,2</sup>, Antonio Vena<sup>1,2</sup>,  
Jesús Guinea<sup>1-3</sup> and Emilio Bouza<sup>1-4</sup>

<sup>1</sup>Clinical Microbiology and Infectious Diseases Department, Hospital General Universitario Gregorio Marañón, Madrid, Spain; <sup>2</sup>Instituto de Investigación Sanitaria del Hospital Gregorio Marañón, Madrid, Spain; <sup>3</sup>CIBER Enfermedades Respiratorias-CIBERES (CB06/06/0058), Madrid, Spain; <sup>4</sup>Medicine Department, School of Medicine, Universidad Complutense de Madrid, Madrid, Spain

\*Corresponding author. Servicio de Microbiología Clínica y Enfermedades Infecciosas, Hospital General Universitario Gregorio Marañón, C/ Dr Esquerdo 46, 28007 Madrid, Spain. Tel: +34-91-586-6725; Fax: +34-91-504-4906; E-mail: pmunoz@hggm.es

Received 12 March 2015; returned 8 June 2015; revised 12 July 2015; accepted 13 July 2015

**Objectives:** Initiation of empirical antifungal therapy for invasive candidiasis (IC) is usually based on clinical suspicion. Serological biomarkers have not yet been studied as a means of ruling out IC. We evaluated the potential role of two combined biomarkers in stopping unnecessary antifungals in patients at risk of IC in the ICU and in other wards.

**Methods:** This was a prospective observational study including adults starting empirical antifungal treatment for suspected IC, at Gregorio Marañón Hospital, Madrid (Spain). Patients were stratified according to admission department (ICU or other wards) and final diagnosis (no IC or proven or probable IC). Type of candidiasis (candidaemia or deep-seated candidiasis) was also considered. The *Candida albicans* germ tube antibody (CAGTA) test and the  $\beta$ -D-glucan (BDG) test were performed on serum samples collected by venepuncture on days 0, 3 and 5 after starting empirical antifungal therapy.

**Results:** Sixty-three ICU patients and 37 non-ICU patients were included. High-risk gastrointestinal surgery and sepsis in non-surgical patients were the main indications for empirical treatment (30% each). Patients had no IC (58%), proven IC (30%) or probable IC (12%). Overall, sensitivity and negative predictive value of the combination of both the CAGTA test and the BDG test were 97% for the entire population. The best performance was observed in ICU patients (sensitivity and negative predictive value of 100%). Among patients without IC, all biomarkers were negative in 31 patients.

**Conclusions:** Serial determination of CAGTA/BDG during empirical antifungal therapy has a high sensitivity and negative predictive value. If properly confirmed, this strategy could be used to discontinue antifungal treatment in at least 31% of patients as a complementary tool in antifungal stewardship programmes.

## Introduction

Overuse of antifungal drugs is explained partially by the high morbidity and mortality associated with candidaemia and invasive candidiasis (IC). In addition, conventional microbiological techniques are slow and lack sensitivity.<sup>1,2</sup> In most patients with suspected IC, blood cultures remain negative 5 days after initiation of antifungal agents.<sup>3,4</sup> However, clinicians still find it difficult to decide when it is safe to stop empirical antifungal therapy even in patients with negative cultures, since a potential role of the antifungal drug is difficult to exclude in patients with either good or poor evolution.

Non-culture diagnostic techniques based on serological biomarkers, such as anti-mycelium antibodies [*Candida albicans* germ tube antibody (CAGTA) test], (1 $\rightarrow$ 3)- $\beta$ -D-glucan (BDG), mannan antigen and anti-mannan antibodies, have been tested to improve the initial diagnosis of IC, but not to exclude it.<sup>5-7</sup> Besides, there is little information on the behaviour of biomarkers in patients with deep-seated candidiasis and negative blood cultures.<sup>7</sup> The limitations of individual tests include false positives and negatives and difficult interpretation of indeterminate results.<sup>8</sup> The value of combining tests to evaluate continuation of empirical antifungal treatment after 5 days of therapy has not been assessed.



Our aim was to evaluate the diagnostic value of the combination of two *Candida* biomarkers, CAGTA and BDG,<sup>9</sup> in ruling out disease in patients receiving empirical therapy for suspected IC.

Methods

We performed an observational, prospective study from June 2012 to January 2014 in Gregorio Marañón General Hospital (Madrid, Spain), serving a population of ~715 000 inhabitants. Inclusion criteria were the following: non-pregnant adult patients with non-haematological conditions receiving systemic empirical antifungal treatment for suspected IC according to local and international guidelines,<sup>10–13</sup> who agreed to participate after giving their written informed consent. Exclusion criteria were the following: known proven IC at inclusion; previous antifungal therapy for >5 days; or therapy to treat invasive fungal infections other than IC.

Serum samples were collected by venepuncture on days 0, 3 and 5 after starting antifungal treatment to determine CAGTA and BDG. The biomarker results were not reported to the attending clinicians. Routine microbiological tests (blood culture, catheter culture and culture of other clinical samples) and radiological tests were also performed according to conventional clinical practice and local guidelines. At the end of the study, each patient’s history was independently reviewed by three investigators blind to the biomarker results. If the classification of the cases was discordant or doubtful, then episodes were reconsidered and classified in a clinical session (unanimous agreement was required). The results were analysed for the whole cohort and also after stratification according to whether the patient had been admitted to a critical care unit or to a medical or surgical ward.

Clinical and microbiological data were prospectively collected using a pre-established protocol that included: patients’ demographics; risk factors for IC; severity of illness at the time of study inclusion; sepsis criteria; type and length of antifungal therapy; results of radiological and microbiological tests; overall mortality during hospitalization; and length of hospital stay. As for microbiological variables, we collected the type of IC, origin of infection and species isolated.

Possible reasons for false-positive BDG results (albumin administration,<sup>14–16</sup> intravenous immunoglobulin,<sup>15–18</sup>  $\beta$ -lactam antibiotics,<sup>19</sup> transfusion of blood products,<sup>15,16,18,20–22</sup> renal replacement therapy,<sup>15,16</sup> abdominal surgery,<sup>15,16</sup> bacteraemia<sup>15,16,23</sup> and bilirubin >10×1.1 mg/dL<sup>15</sup>) were also collected. Patients from whom fewer than three serum samples were obtained were excluded from the analysis.

In order to explore the role of biomarkers in clinical settings with different pre-test probabilities of having fungal infection, we further classified our patients according to their main pathophysiological pattern into the four groups suggested by Eggimann and Pittet<sup>24</sup> and Leon *et al.*:<sup>25</sup> immunosuppressed patients (onco-haematological patients and solid organ transplant recipients); high-risk digestive surgery patients (including tertiary peritonitis, anastomotic leakage, recurrent digestive perforation and necrotizing pancreatitis); other abdominal surgery patients; and other patients (non-abdominal surgery and medical patients).

Definitions

Proven IC was defined as identification of *Candida* species in blood cultures or positivity in histopathological, cytopathological or microscopic examination of normally sterile clinical samples obtained by biopsy or needle aspiration and/or recovery of *Candida* species by culture of a sample obtained by means of a sterile procedure from a normally sterile site showing a clinical or radiological abnormality consistent with an infectious disease.<sup>13</sup>

Intra-abdominal candidiasis was defined as the recovery of *Candida* spp. from a deep intra-abdominal sample obtained by a sterile procedure (including surgery, puncture and drains placed for <24 h) in patients showing clinical or radiological abnormalities consistent with an infectious disease process.<sup>26</sup>

Probable IC was defined as fever ( $\geq 38.5^{\circ}\text{C}$ ) or hypothermia ( $< 35^{\circ}\text{C}$ ) with leucocytosis (white blood cell count  $\geq 12000$  cells/mm<sup>3</sup>) and/or haemodynamic instability (mean arterial pressure <65 mmHg) otherwise unexplained despite at least 3 days of broad-spectrum antibiotics and both of the following: (i) *Candida* spp. isolated from at least two non-sterile sites ( $\pm 3$  days); and (ii) no alternative microbiological diagnosis. Symptomatic urinary tract infection due to *Candida* spp. with no other microbiological diagnosis and endoscopically visualized oesophagitis with histological and microbiological biopsy exclusion of other causes than *Candida* on microscopy or culture were also considered probable IC.<sup>16</sup>

IC was excluded when the criteria for proven and probable IC were not fulfilled and/or another diagnosis was established.

Patients with IC were further classified into candidaemia without deep-seated *Candida* infection (mainly catheter-related candidaemias), IC without candidaemia (mainly intra-abdominal infections) and IC with candidaemia.<sup>27</sup> Deep-seated candidaemia was defined as the presence of at least one positive blood culture with another positive specimen from a normally sterile site related to a specific focus of infection.

Microbiological methods

Identification of *Candida* spp

*Candida* species were identified using ID 32C (bioMérieux, Marcy-l’Étoile, France).

Serological detection of CAGTA

Serum samples were processed according to the manufacturer’s recommendations (Vircell Microbiologist S.L., Granada, Spain). Samples were considered positive above a cut-off  $\geq 1/160$ .

Serological detection of BDG

The Fungitell<sup>®</sup> assay was performed according to the manufacturer’s instructions and BDG concentrations were read and analysed with a BioTek ELX808<sup>™</sup> Microplate Reader and GEN5 Software (BioTek U.S., VT, USA). The cut-offs for BDG proposed by the manufacturer were as follows: positive,  $\geq 80$  pg/mL; indeterminate,  $\geq 60$  to <79 pg/mL; and negative, <60 pg/mL. We considered BDG to be positive if the value was  $\geq 80$  pg/mL and negative if the value was <80 pg/mL, so that indeterminate results were classified as negative results.<sup>9</sup>

Data analysis

Sensitivity, specificity, positive predictive value (PPV) and negative predictive value (NPV) were calculated on days 0, +3 and +5 for each biomarker independently and in combination.

Two possible models were used to ensure optimal sampling. In model 1 (non-restrictive), the biomarkers were considered positive if any of the six determinations (CAGTA and BDG on days 0, +3 and +5) was positive. In model 2 (partially restrictive model), at least two consecutive positive CAGTA and/or BDG results were required.<sup>7,16,25</sup> Both models were assessed for each biomarker independently and for the combination of CAGTA and BDG.

The performance of the biomarkers was analysed in patients with proven IC, proven plus probable IC and no IC. When we analysed the ‘only proven IC model’, probable cases were included in the no IC group.

We used a two-tailed Fisher exact test to study the correlation between CAGTA and/or BDG positivity in the total population and by risk groups. Normally distributed values are expressed as mean  $\pm$  SD, whereas non-normally distributed values are expressed as median (IQR). Receiver operating characteristic (ROC) curves were plotted to compare model 1, model 2 and CAGTA and BDG combinations for each timepoint (days 0, 3 and 5 from starting empirical antifungal therapy). A *P* value <0.05 was considered statistically significant.

Data were entered in Access 2007, and IBM SPSS Statistics for Windows, version 20.0 (IBM, Corp., Armonk, NY, USA) was used to perform the statistical analysis.

### Ethics approval and patient consent/privacy

The study was approved by the local ethics committee (CEIC-A1, ref. 247/13) and the Spanish Agency for Medicines and Health Care Products (Agencia Española del Medicamento y Productos Sanitarios, AEMPS).

## Results

A total of 260 patients received empirical antifungal treatment during the study period. Of these, 160 were not included in the final analysis for the following reasons: 27 (10.4%) did not sign the informed consent; 56 (21.5%) had fewer than three serum samples (due to death, life expectancy <48 h and transfer to another hospital or hospital discharge); 47 (18.1%) had demonstrated IC at inclusion; and 30 (11.5%) had invasive fungal infections other than candidiasis.

The main demographic and clinical characteristics of the 100 patients included are shown in Table 1. Most patients were male (67%) and the mean age was  $60.8 \pm 15.7$  years. Overall, 63 patients were admitted to the ICU (44% surgical and 19% medical) and 37 to other wards (13% surgical and 24% medical). The main indications for empirical antifungal prescription were high-risk gastrointestinal surgery and sepsis in non-surgical patients (30% each one). The main underlying conditions and the reasons for potential false-positive results with the biomarkers are shown in Table 1.

The 100 patients were finally classified as no IC (58), proven IC (30) and probable IC (12). *C. albicans* accounted for 60% of the isolates in proven IC, mainly in the ICU (88.9% of cases). The diagnosis of proven IC was more frequent in non-ICU patients (56.7%) than in ICU patients (14.3%) ( $P < 0.001$ ). IC without candidaemia (26/30), mostly due to intra-abdominal infections (66.7%), was the principal type of IC found in our study (Table 1). Echinocandins accounted for 73% of empirical therapy (84.1% in the ICU and 54.0% in other wards), and median (IQR) duration of antifungal therapy was 10.0 (6.0–14.0) days. The duration of antifungal therapy in patients without candidiasis was 8.5 (4.0–12.0) days. Overall mortality was 31% (42.9% in ICU patients versus 10.8% in other wards).

Finally, Table 1 shows the efficacy of the combination of biomarkers in ICU patients and non-ICU patients following models 1 and 2. The combination of CAGTA and BDG yielded a sensitivity of 100% in ICU patients and 95.2% in non-ICU patients with model 1. The sensitivity in model 2, however, was 88.9% in the ICU and 80.9% in non-ICU wards.

Table 2 and Table S1 (available as Supplementary data at JAC Online) show the behaviour of biomarkers alone and in combination and considering IC as either proven or both proven and probable. As for CAGTA, sensitivities ranged from 53.3% to 60.0% and NPVs from 72.7% to 83.6% when results were evaluated on the three different days and when only proven or proven plus probable cases were considered. No clear improvement in sensitivity and NPV was demonstrated when the three days were analysed together with model 1 or with model 2 (sensitivity 60.0% and NPV 83%).

On the other hand, BDG yielded better results when the three days were analysed together with model 1 (sensitivity 86.7% and

NPV 90.2%) than with model 2 (sensitivity 73.3% and NPV 86.0%) or for each timepoint independently (Table S1).

However, the results were better when both tests were used in combination (sensitivity 80.0%–93.3% and NPV 87.5%–95.6%). When the three samples were analysed together, model 1 sensitivity reached 96.7% with an NPV of 97.1%. Nevertheless, with model 2, neither the sensitivity nor the NPV improved (sensitivity 83.3% and NPV 90%).

As expected, the inclusion of probable IC as cases lowered the sensitivity and NPV but increased the specificity and PPV. In this scenario, only model 1 showed sensitivity and NPV >90% (Table S1).

The ROC curves (Figure 1) of the combined biomarkers (model 1 or 2 and for each timepoint—days 0, +3 and +5) showed that the best sensitivities were achieved with the combination of CAGTA and BDG using model 1 (sensitivity 96.7%, specificity 47.1%, AUC 0.719) and with the combination of CAGTA and BDG on day +5 (sensitivity 93.3%, specificity 61.4%, AUC 0.774).

Table 3 shows the behaviour of the biomarkers in the whole population and in ICU versus non-ICU patients. Overall, 96.7% of proven IC (29/30 cases) met the premise of model 1, while only 83.3% (25/30 cases) met the conditions of model 2. When patients with probable IC were also considered, the combination of biomarkers was positive in 10/12 cases (83.3%) in both models. The three results classified as potential false negatives (all negative biomarkers) occurred in patients fulfilling the definitions (one proven and two probable IC), although the significance of the *Candida* isolate was doubtful. The first one corresponded to *C. glabrata* recovered from a mixed culture of a percutaneous cholecystostomy sample in a patient with pancreatitis (classified as proven candidiasis according to definitions). The other two corresponded to *Candida* spp. (from two non-sterile sites) recovered from respiratory cultures in an HIV-infected patient with severe oral candidiasis and possible oesophagitis and from a patient with severe pancreatitis. Given their poor clinical situation, both patients were given systemic antifungals, and the cases were classified as probable candidiasis.

Among patients without IC, all biomarkers were negative in 31/58 patients (53.4%) and there were 27 false-positive results. False positives were more common in the ICU (51.2%) than in non-ICU wards (33.3%). Potential causes for these false positive results, such as abdominal surgery within 48 h (17), administration of albumin (12) and renal replacement therapy (11), were significantly more common in the ICU. Multifocal *Candida* colonization was significantly more common in patients with proven (66.7%) or probable (100%) IC than in patients without infection (19%) ( $P < 0.001$ ).

## Discussion

Our study suggests that the combination of CAGTA and BDG could be used to safely stop antifungals on day 5 in a substantial proportion (31%) of patients receiving empirical antifungal therapy, both in the ICU and in non-ICU wards.

Experts accept that reducing unnecessary use of antifungals should be one of the major goals of stewardship programmes. Empirical antifungal therapy accounts for around 42% of antifungal use in tertiary hospitals<sup>4,25,28–30</sup> and is prescribed mainly to critically ill patients admitted to the ICU.<sup>3,28,31</sup> Although clinical guidelines support and recommend this therapy in high-risk

**Table 1.** Demographic characteristics of patients receiving empirical antifungal therapy

	Total (n = 100)	ICU (n = 63)	Non-ICU (n = 37)	P	
Male, n (%)	67 (67.0)	41 (65.1)	26 (70.3)	0.594	410
Age (years), mean ± SD	60.8 ± 15.7	60.8 ± 15.0	60.8 ± 17.1	0.881	
Length of stay in hospital (days), median (IQR)	56.5 (29.2–91.7)	61.0 (30.0–91.0)	50.0 (21.5–101.5)	0.620	
Length of stay in hospital (days) until empirical antifungal treatment, median (IQR)					
proven IC	21.5 (12.7–35.2)	32.0 (11.0–66.0)	21.0 (10.5–30.0)	0.263	415
probable IC	13.0 (6.2–28.0)	13.0 (6.0–22.0)	30.0 <sup>c</sup>	0.500	
no IC	9.5 (4.7–20.0)	11.0 (5.0–20.0)	9.0 (4.0–27.0)	0.790	
Underlying disease on admission, n (%)					
solid tumours	22 (22.0)	16 (25.4)	6 (16.2)	0.285	420
intestinal perforation	20 (20.0)	15 (23.8)	5 (13.5)	0.214	
severe cardiovascular disorders	19 (19.0)	12 (19.0)	7 (18.9)	0.987	
acute pancreatitis	11 (11.0)	3 (4.8)	8 (21.6)	0.009	
cirrhosis	7 (7.0)	4 (6.3)	3 (8.1)	0.739	
solid organ transplantation (previous)	7 (7.0)	3 (4.8)	4 (10.8)	0.252	425
HIV infection	2 (2.0)	1 (1.6)	1 (2.7)	0.700	
genitourinary disorders	2 (2.0)	—	2 (5.4)	0.062	
autoimmune disease	2 (2.0)	2 (3.2)	—	0.274	
others	8 (8.0)	7 (11.1)	1 (2.7)	0.135	
Stratification of patients with suspected IC, n (%)					430
high-risk digestive tract surgery <sup>a</sup>	30 (30.0)	22 (34.9)	8 (21.6)	0.161	
other abdominal surgery	18 (18.0)	10 (15.9)	8 (21.6)	0.470	
non-abdominal surgery	13 (13.0)	9 (14.3)	4 (10.8)	0.618	
non-surgical	30 (30.0)	18 (28.6)	12 (32.4)	0.684	
immunosuppressed <sup>b</sup>	9 (9.0)	4 (6.3)	5 (13.5)	0.227	435
Classification of the episode, n (%)					
proven IC	30 (30.0)	9 (14.3)	21 (56.7)	<0.001	
IC without candidaemia <sup>c</sup>	26 (26.0)	8 (12.7)	18 (48.6)	<0.001	
candidaemia without deep-seated infection <sup>d</sup>	3 (3.0)	1 (1.6)	2 (5.4)	0.280	440
IC with candidaemia <sup>e</sup>	1 (1.0)	0 (0.0)	1 (2.7)	0.190	
probable IC	12 (12.0)	11 (17.5)	1 (2.7)	0.028	
no IC	58 (58.0)	43 (68.2)	15 (40.5)	0.007	
Origin of proven IC, n (%)					
intra-abdominal infection <sup>f</sup>	20 (66.7)	6 (66.7)	14 (66.7)	0.002	445
prosthetic (non-catheter) infection <sup>g</sup>	3 (10.0)	—	3 (14.3)	0.022	
empyema	2 (6.7)	1 (11.1)	1 (4.8)	0.700	
others <sup>h</sup>	5 (16.7)	2 (22.2)	3 (14.3)	0.441	
<i>Candida</i> spp. in proven IC, n (%)					450
<i>albicans</i>	21 (70.0)	8 (88.9)	13 (61.9)	0.183	
<i>glabrata</i>	4 (13.3)	1 (11.1)	3 (14.3)	0.815	
<i>parapsilosis</i>	2 (6.7)	—	2 (9.5)	0.326	
other	3 (9.9)	—	3 (9.9)	0.495	
Potential causes of false-positive results, n (%)					455
blood product transfusion	50 (50.0)	34 (54.0)	16 (43.2)	0.300	
abdominal surgery within 48 h	49 (49.0)	37 (58.7)	2 (5.4)	0.011	
piperacillin/tazobactam	38 (38.0)	26 (41.3)	12 (32.4)	0.379	
albumin	30 (30.0)	23 (36.5)	7 (18.9)	0.05	
renal replacement therapy	25 (25.0)	22 (34.9)	3 (8.1)	0.003	460
bacteraemia <sup>i</sup>	22 (22.0)	17 (27.0)	5 (13.5)	0.116	
bilirubin ≥10×1.1 mg/dL	5 (5.0)	3 (4.8)	2 (5.4)	0.887	
intravenous immunoglobulin	6 (6.0)	4 (6.3)	2 (5.4)	0.848	

Continued

Table 1. Continued

	Total (n=100)	ICU (n=63)	Non-ICU (n=37)	P	
amoxicillin/clavulanic acid	4 (4.0)	2 (3.2)	2 (5.4)	0.583	
multifocal <i>Candida</i> colonization	43 (43.0)	27 (42.9)	16 (43.2)	0.970	
Empirical antifungal treatment					
empirical drug, n (%)					
echinocandins	73 (73.0)	53 (84.1)	20 (54.0)	0.001	
fluconazole	20 (20.0)	8 (12.7)	12 (32.4)	0.017	
amphotericin B	5 (5.0)	1 (1.6)	4 (10.8)	0.041	
other azoles	2 (2.0)	1 (1.6)	1 (2.7)	0.700	
overall (treatment days), median (IQR)	10.0 (4.2–15.0)	9.0 (4.0–12.0)	12.0 (5.5–21.5)	0.014	
proven IC	12 (4.0–21.0)	10.0 (2.0–18.0)	13.0 (6.5–21.5)	0.209	
probable IC	10.5 (7.0–14.7)	10.0 (7.0–14.0)	26.0 <sup>j</sup>	0.167	
no IC	8.5 (4.0–12.0)	8.0 (4.0–11.0)	10.0 (4.0–16.0)	0.230	
echinocandins	10.0 (6.0–14.0)	9.0 (5.0–12.0)	12.0 (7.2–19.7)	0.027	
fluconazole	10.5 (3.2–25.0)	7.0 (3.2–13.2)	14.5 (3.2–26.0)	0.427	
amphotericin B	4.0 (3.5–21.0)	4.0 <sup>j</sup>	11.0 (3.2–22.5)	0.800	
Sepsis criteria, n (%)					
sepsis	35 (35.0)	15 (23.8)	20 (54.1)	0.020	
severe sepsis	24 (24.0)	12 (19.0)	12 (32.4)	0.130	
septic shock	30 (30.0)	27 (42.9)	3 (8.1)	<0.001	
multiorgan failure	11 (11.0)	9 (14.3)	2 (5.4)	0.171	
Overall mortality, n (%)	31 (31.0)	27 (42.9)	4 (10.8)	0.001	
no IC	16 (27.6)	15 (20.8)	1 (2.7)	0.035	
proven IC	7 (23.3)	5 (55.5)	2 (9.5)	0.006	
probable IC	8 (66.7)	7 (63.6)	1 (100.0)	0.460	
Models of CAGTA and BDG combinations in proven IC					
model 1					
sensitivity, % (95% CI)	96.7 (80.9–99.8)	100.0 (62.9–99.0)	95.2 (74.1–99.7)	—	
specificity, % (95% CI)	47.1 (35.4–59.2)	42.6 (29.5–56.7)	62.5 (35.9–83.7)	—	
PPV, % (95% CI)	43.9 (31.9–56.6)	22.5 (11.4–38.9)	76.9 (55.9–90.2)	—	
NPV, % (95% CI)	97.1 (82.9–99.8)	100.0 (82.2–99.6)	90.9 (57.1–99.5)	—	
accuracy, % (95% CI)	62.0 (51.7–71.4)	50.8 (38.0–63.5)	81.1 (64.3–91.4)	—	
model 2					
sensitivity, % (95% CI)	83.3 (64.5–93.7)	88.9 (50.7–99.4)	80.9 (57.4–93.7)	—	
specificity, % (95% CI)	64.3 (51.9–75.1)	59.3 (45.1–72.1)	81.2 (53.7–95.0)	—	
PPV, % (95% CI)	50.0 (35.7–64.3)	26.7 (13.0–46.2)	85.0 (61.1–96.0)	—	
NPV, % (95% CI)	90.0 (77.4–96.3)	97.0 (82.5–99.8)	76.5 (49.8–92.2)	—	
accuracy, % (95% CI)	70.0 (59.9–78.5)	63.5 (50.3–75.0)	81.1 (64.3–91.4)	—	

<sup>a</sup>High-risk digestive tract surgery included tertiary peritonitis, anastomotic leakage, recurrent digestive perforation and necrotizing pancreatitis.

<sup>b</sup>Immunosuppressed patients included onco-haematological patients, solid organ transplant recipients and others.

<sup>c</sup>Nineteen (73.1%) intra-abdominal infections; 3 (11.5%) prosthetic (non-catheter) infections; 2 (7.7%) empyema; 1 (3.8%) urinary tract infection; and 1 (3.8%) meningitis.

<sup>d</sup>Two (6.7%) catheter-related candidaemias [1 (11.1%) in ICU patients and 1 (4.8%) in non-ICU patients] and 1 (3.3%) primary candidaemia [1 (4.8%) in non-ICU patients].

<sup>e</sup>One (3.3%) candidaemia related to intra-abdominal infection [1 (4.8%) in non-ICU patients].

<sup>f</sup>Nineteen (63.3%) intra-abdominal infections included peritonitis, intra-abdominal abscess and intra-abdominal drain placed for <24 h [6 (66.7%) in ICU patients and 13 (61.9%) in non-ICU patients].

<sup>g</sup>Three (10.0%) prosthetic (non-catheter) infections [3 (14.3%) in non-ICU patients] included 1 (4.8%) pacemaker, 1 (4.8%) aorta-abdominal bypass and 1 (4.8%) peripheral vascular bypass.

<sup>h</sup>Others: 1 (3.3%) meningitis [1 (11.1%) in ICU patients]; 1 (3.3%) urinary infection [1 (4.8%) in non-ICU patients], 2 (6.7%) catheter-related candidaemias [1 (11.1%) in ICU patients and 1 (4.8%) in non-ICU patients] and 1 (3.3%) primary candidaemia [1 (4.8%) in non-ICU patients].

<sup>i</sup>Bacteraemia [n=22 (22%)]: 13 (59.1%) due to Gram-positive bacteria included 4 (18.2%) *Enterococcus* spp., 4 (18.2%) CoNS, 3 (13.6%) *Staphylococcus aureus* and 2 (9.1%) mixed cultures of Gram-negative bacteria + *Enterococcus* spp.

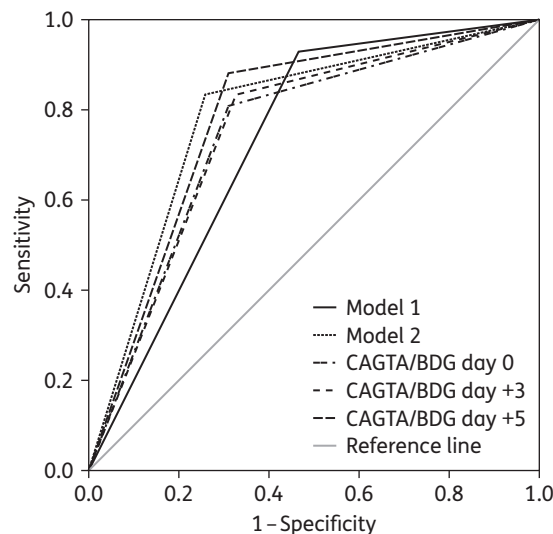
<sup>j</sup>Only one case.



**Table 2.** Analysis of biomarker results alone or in combination and requesting only one positive result (model 1) or at least two consecutive positive results (model 2) for the total days (days 0, 3 and 5 from starting empirical antifungal treatment) in patients with proven IC

	Sensitivity % (95% CI)	Specificity % (95% CI)	PPV % (95% CI)	NPV % (95% CI)
Model 1 CAGTA	60.0 (40.7–76.8)	85.7 (74.8–92.6)	64.3 (44.1–80.7)	83.3 (72.3–90.7)
Model 2 CAGTA	60.0 (40.7–76.8)	87.1 (76.5–93.6)	66.7 (46.0–82.8)	83.6 (72.6–90.9)
Model 1 BDG	86.7 (68.4–95.6)	52.9 (40.6–64.8)	44.1 (31.4–57.5)	90.2 (75.9–96.8)
Model 2 BDG	73.3 (53.8–87.0)	70.0 (57.1–80.1)	51.2 (35.7–66.4)	86.0 (73.6–93.3)
Model 1 CAGTA/BDG	96.7 (80.9–99.8)	47.1 (35.4–59.4)	43.9 (31.9–56.6)	97.1 (82.9–99.8)
Model 2 CAGTA/BDG	83.3 (64.5–93.7)	64.3 (51.9–75.1)	50.0 (35.7–64.3)	90.0 (77.4–96.3)

Combination CAGTA/BDG was considered positive if at least one of CAGTA or BDG was positive. Data for each timepoint (days 0, 3 and 5 from starting empirical antifungal therapy) for CAGTA, BDG and for the combination CAGTA and BDG are available in Table S1. We also provide the same results analysing proven plus probable cases together.



**Figure 1.** ROC curves showing the efficacy of biomarkers alone or in combination and requesting only one positive result (model 1) or at least two consecutive positive results (model 2) for the total days (days 0, 3 and 5 from starting empirical antifungal treatment). Model 1 (non-restrictive model): if at least one test result (CAGTA or BDG) was positive on any of the three days. Model 2 (partially restrictive model): if at least two consecutive CAGTA and/or BDG test results were positive. Model 1: sensitivity, 96.7%; specificity, 47.1%; AUC, 0.732 (0.633–0.830). Model 2: sensitivity, 83.3%; specificity, 64.3%; AUC, 0.787 (0.694–0.880). CAGTA/BDG day 0: sensitivity, 80.0%; specificity, 60.0%; AUC, 0.750 (0.651–0.848). CAGTA/BDG day +3: sensitivity, 83.3%; specificity, 58.6%; AUC, 0.753 (0.655–0.851). CAGTA/BDG day +5: sensitivity, 93.3%; specificity, 61.4%; AUC, 0.785 (0.693–0.877).

patients,<sup>12</sup> prescriptions in this group were more often inappropriate than in others (57% in our experience), mainly because of excessive duration of therapy<sup>29</sup> and incorrect indication, as recently demonstrated elsewhere.<sup>3,4,29,30</sup>

Our results show that the problem in the ICU (high suspicion and relatively low prevalence of infection among treated patients; 14.3% in our series) differs from other wards (low suspicion and high prevalence of infection in empirically treated patients; 56.7% in our series). In fact, higher mortality rates have been recorded for candidaemia occurring in the internal medicine

department than in the ICU in some series.<sup>32</sup> Patients in medical and surgical wards may have very significant risk factors for development of invasive mycoses.<sup>33–36</sup> Although we only included patients receiving antifungal therapy, ours is one of the few studies that have analysed both types of population, reflecting real-life use of empirical antifungals in a tertiary institution.

Our study also shows that IC was finally proven in 30% of empirically treated patients (42% if we include probable cases), thus demonstrating that the population included in our series was at high risk. Accordingly, the indication to start antifungals early would be acted on in most cases.<sup>1,37</sup> The main problem is that antifungals are maintained for approximately 10 days in patients without IC (11.7 days in non-ICU wards), with the associated unnecessary risk of toxicity and expense. The low sensitivity of blood cultures complicates the decision to stop antifungal treatment safely. Thus, alternative approaches that do not rely on waiting for positive culture results are urgently needed.<sup>4</sup> The most interesting result of our study was that the combination of negative CAGTA and BDG tests would have enabled antifungal therapy to be stopped early in 53% of the patients with no IC (48.8% in ICUs and 66.7% in non-ICU wards) on day 5, with a sensitivity of at least 97%.

The few studies that have analysed CAGTA have done so mainly in onco-haematological patients and in patients admitted to the ICU. The diagnostic performance of the test has shown sensitivities of around 84%–87% and specificities of 95%.<sup>25,38</sup> Other potential advantages are the low cost and potential usefulness when discriminating between colonization and infection, and between deep-seated candidaemia and catheter-related candidaemia.<sup>33,38</sup> When CAGTA was used alone, we found that it had a sensitivity of 60%, a specificity of 85% and an NPV of 83%. The slightly lower specificity obtained in the present work with CAGTA in comparison with previous studies is probably due to the difference in study populations (empirical antifungal therapy versus patients with candidaemia).<sup>9</sup> In addition, there was little variation between the three sequential days tested. Interestingly, 13% of the patients (four) with IC had an initial negative CAGTA that became positive on day +5. Other authors have also described this pattern in 31.8% of ICU patients.<sup>39</sup>

Different studies have examined the role of BDG in the diagnosis of IC and report a mean sensitivity of 75% and specificity of 80%.<sup>2,7</sup> In our study, BDG had a sensitivity of 96.7% with a specificity of 47.1%. In general, specificity and PPV are lower in ICU patients (specificity 42.6% and PPV 22.5% in the ICU versus

Table 3. Results for patients with at least one positive IC biomarker or with all of them negative

	Proven IC (n=30) <sup>a</sup>			Probable IC (n=12)			Proven + probable IC (n=42) <sup>c</sup>			No IC (n=58) <sup>a</sup>		
	overall	ICU (n=9)	non-ICU (n=21)	overall	ICU (n=11)	non-ICU (n=1)	overall	ICU (n=20)	non-ICU (n=22)	overall	ICU (n=43)	non-ICU (n=15)
	(n=30)			(n=12)			(n=42)			(n=58)		
Model 1 <sup>b</sup>	29 (96.7%)	9 (100.0%)	20 (95.2%)	10 (83.3%)	9 (81.8%)	1 (100.0%)	39 (92.9%)	18 (90.0%)	21 (95.5%)	27 (46.6%)	22 (51.2%)	5 (33.3%)
Model 2 <sup>c</sup>	25 (83.3%)	8 (88.9%)	17 (81.0%)	10 (83.3%)	9 (81.8%)	1 (100.0%)	35 (83.3%)	17 (85.0%)	18 (81.8%)	15 (25.9%)	13 (30.2%)	2 (13.3%)
All IC biomarkers were negative	1 (3.3%)	0 (0.0%)	1 (4.8%)	2 (16.7%)	2 (18.2%)	0 (0.0%)	3 (7.1%)	2 (10.0%)	1 (4.5%)	31 (53.4%)	21 (48.8%)	10 (66.7%)

<sup>a</sup>p<0.05.

<sup>b</sup>Model 1 (non-restrictive model): if at least one test result (CAGTA or BDG) was positive on any of the three days.

<sup>c</sup>Model 2 (partially restrictive model): if at least two consecutive CAGTA and/or BDG test results were positive.

62.5% and 76.9% in non-ICU wards). This finding, which has been reported elsewhere, may be due to the higher exposure to causes of false positivity in the ICU (51.2% in the ICU versus 33.3% in non-ICU wards).<sup>5,16</sup> BDG is a promising tool in intra-abdominal candidiasis, as demonstrated by Tissot *et al.*,<sup>7</sup> who showed that two consecutive positive BDG results have a sensitivity and specificity of 65% and 78%, respectively.

Our study demonstrates that the option with the highest NPV is the combination CAGTA/BDG. Accordingly, the combination of CAGTA and BDG may be a very promising tool, not for establishing the diagnosis of IC but for ruling out the infection in patients who receive empirical antifungal therapy. The best results (sensitivity 96.7% and NPV 97.1%) were achieved when the combination was considered positive if any of the six tests performed were positive (CAGTA and BDG on days 0, +3 and +5). With this non-restrictive model (model 1), only one patient with potential proven candidiasis (*Candida* recovered from a cholecystostomy with multiple bacterial isolates) had a negative result. This patient was in a medical ward; thus, the sensitivity and NPV of the model was 100% for ICU patients and 95.2% and 90.9% for patients in non-ICU wards. Other previous studies emphasized the superiority of the diagnostic value of combining CAGTA and BDG.<sup>6,9,25,40</sup>

Our results suggest that the most effective strategy would probably be to provide the clinician with the results of IC biomarkers on day +5 of empirical therapy (sensitivity 93.3% and NPV 95.6%), when the definite results of the blood cultures are also available. Our approach would have made it possible to stop antifungals in the 31 patients whose biomarker results were negative and who did not have IC. Considering that the mean duration of therapy was 10 days, we calculated that avoiding 5 days of therapy in 31 patients would account for 15.6% of the antifungals used in this study (~€78 000 in cost). Furthermore, since our hospital consumes ~€3 million in antifungals per year, a saving of 15% would enable us to reduce costs by €468 000 per year. The relatively low cost of these six diagnostic tests for 100 patients (nearly €12 000; €10 for each CAGTA and €30 for each BDG test) highlights the cost-effectiveness of our approach. More effective designs, such as performing the biomarker tests earlier or only performing the tests on day 5, could also be studied. In our experience, performing the tests only on day 5 yielded a sensitivity of 93.3% and an NPV of 95.6%. No differences were observed when we analysed the use of the tests on days 3 and 5 (sensitivity 93.3% and NPV 94.9%).

Our study is subject to a series of limitations. The first is the high rate of false-positive results using the non-restrictive model. Overall, false positives accounted for 55% of the positive results in ICU patients and 19% in non-ICU patients. This rate could be reduced; however, as our objective was to include the combination strategy in our antifungal stewardship model, patient safety was our main goal. While it is useful to know that administration of albumin or intravenous immunoglobulins, renal replacement therapy and multifocal colonization could yield false-positive BDG results, patients requiring these therapies are sometimes also at high risk of candidiasis.<sup>7,14</sup> However, the risk of inducing unnecessary treatment exists and we cannot either exclude that discontinuation of the antifungals in patients with no IC does not cause harm to them, so, in our opinion, a randomized clinical trial is needed. Till then, the implications of IC biomarker results for therapeutic decisions should be determined by

experts in the field.<sup>30,38,41</sup> Besides, we have not analysed the potential impact of different degrees of *Candida* colonization on the levels of biomarkers.

The second limitation is that our study was performed in a single centre, although it reflects real use of antifungals in a general hospital. Nevertheless, our results should be replicated elsewhere before our conclusions can be incorporated into antifungal strategies.

Finally, a third possible limitation is the difficulty in making a diagnosis of intra-abdominal candidiasis. Although we have been very strict with the criteria and infection was considered as proven only when *Candida* was recovered from normally sterile samples, its role in polymicrobial cultures may be sometimes difficult to establish.

In summary, serial determination of CAGTA and BDG during the first days of empirical antifungal therapy has a very high sensitivity and NPV. If confirmed in a randomized clinical trial, this strategy could be used to discontinue antifungal treatment in at least 31% of patients. It could be also be used as a complementary tool in antifungal stewardship programmes.

## Acknowledgements

José María Bellón (Fundación para la Investigación Biomédica del Hospital Gregorio Marañón) contributed to the statistical analysis.

We are grateful to the nursing staff of Hospital General Universitario Gregorio Marañón, without whose collaboration the study could not have taken place. We are especially grateful to Leonor Azcarate Galbis, Carmen Sainz Pardo Rodríguez, Dolores González Baz, Ana María Fernández García, Carmen González García, Francisca Añez Rapado, Ana María Hernández Gamo, Sonia Montoto Bermejo, Carmen Heras Escobar, Mar Díaz Salcedo, Aurelia Martínez Pérez de Tudela, Mar Sánchez Ayuso, Amalia Checa Amaro, Ana I. Viñaras Fragueiro, Gema Moreno Fernández, Leticia Cabeza Tejeda, Carolina Lerin Cuevas, Pablo Lerma Lara, Sara Carrasco Harinero, Miguel López Díaz, Diana de Agustín Subinas, Raquel de Blas Hernando, Manuela Rodríguez Ramos, Raúl Merchán Arjona, Sara Robles Carmenes, Antonio Revuelta Lema, Carmen Gómez Aguado, Elena Pérez Menéndez, Susana Velasco Cabezas, Rosa María Menéndez Tarín, Patricia Sánchez Sinoco, Dolores Maestre Ortiz and others.

The CAGTA kits were kindly provided by Joaquín Mendoza (Vircell Microbiologist S.L., Granada, Spain).

## Funding

This study was supported by grants from Fondo de Investigación Sanitaria (grant numbers PI13/01148, PI11/00167 and PI10/02868). M. C. M.-J. is supported by Fundación para la Investigación Biomédica del Hospital Gregorio Marañón. J. G. is supported by a Miguel Servet contract from the FIS (MS09/00055). The Fundación para la Investigación Biomédica del Hospital Gregorio Marañón (FIBHGM) was the study promoter (ref. EONC002–2013).

## Transparency declarations

None to declare.

## Supplementary data

Table S1 is available as Supplementary data at JAC Online (<http://jac.oxfordjournals.org/>).

## References

- 1 Morrell M, Fraser VJ, Kollef MH. Delaying the empiric treatment of *Candida* bloodstream infection until positive blood culture results are obtained: a potential risk factor for hospital mortality. *Antimicrob Agents Chemother* 2005; **49**: 3640–5.
- 2 Clancy CJ, Nguyen MH. Undiagnosed invasive candidiasis: incorporating non-culture diagnostics into rational prophylactic and preemptive antifungal strategies. *Expert Rev Anti Infect Ther* 2014; **12**: 731–4.
- 3 Azoulay E, Dupont H, Tabah A *et al.* Systemic antifungal therapy in critically ill patients without invasive fungal infection. *Crit Care Med* 2012; **40**: 813–22.
- 4 Lam SW, Eschenauer GA, Carver PL. Evolving role of early antifungals in the adult intensive care unit. *Crit Care Med* 2009; **37**: 1580–93.
- 5 Mohr JF, Sims C, Paetznick V *et al.* Prospective survey of (1→3)- $\beta$ -D-glucan and its relationship to invasive candidiasis in the surgical intensive care unit setting. *J Clin Microbiol* 2011; **49**: 58–61.
- 6 Leon C, Ruiz-Santana S, Saavedra P *et al.* Value of  $\beta$ -D-glucan and *Candida albicans* germ tube antibody for discriminating between *Candida* colonization and invasive candidiasis in patients with severe abdominal conditions. *Intensive Care Med* 2012; **38**: 1315–25.
- 7 Tissot F, Lamoth F, Hauser PM *et al.*  $\beta$ -Glucan antigenemia anticipates diagnosis of blood culture-negative intraabdominal candidiasis. *Am J Respir Crit Care Med* 2013; **188**: 1100–9.
- 8 Ponton J, del Palacio A. [Advances and limitations in the early diagnosis of invasive yeast infections.] *Rev Iberoam Micol* 2007; **24**: 181–6.
- 9 Martínez-Jiménez MC, Muñoz P, Valerio M *et al.* *Candida* biomarkers in patients with candidaemia and bacteraemia. *J Antimicrob Chemother* 2015; **70**: 2354–61.
- 10 Cornely OA, Bassetti M, Calandra T *et al.* ESCMID guideline for the diagnosis and management of *Candida* diseases 2012: non-neutropenic adult patients. *Clin Microbiol Infect* 2012; **18** Suppl 7: 19–37.
- 11 Cuenca-Estrella M, Verweij PE, Arendrup MC *et al.* ESCMID guideline for the diagnosis and management of *Candida* diseases 2012: diagnostic procedures. *Clin Microbiol Infect* 2012; **18** Suppl 7: 9–18.
- 12 Pappas PG, Kauffman CA, Andes D *et al.* Clinical practice guidelines for the management of candidiasis: 2009 update by the Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis* 2009; **48**: 503–35.
- 13 De Pauw B, Walsh TJ, Donnelly JP *et al.* Revised definitions of invasive fungal disease from the European Organization for Research and Treatment of Cancer/Invasive Fungal Infections Cooperative Group and the National Institute of Allergy and Infectious Diseases Mycoses Study Group (EORTC/MSG) Consensus Group. *Clin Infect Dis* 2008; **46**: 1813–21.
- 14 Lo Cascio G, Koncan R, Stringari G *et al.* Interference of confounding factors on the use of (1,3)- $\beta$ -D-glucan in the diagnosis of invasive candidiasis in the intensive care unit. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2015; **34**: 357–65.
- 15 Pickering JW, Sant HW, Bowles CA *et al.* Evaluation of a (1→3)- $\beta$ -D-glucan assay for diagnosis of invasive fungal infections. *J Clin Microbiol* 2005; **43**: 5957–62.
- 16 Hanson KE, Pfeiffer CD, Lease ED *et al.*  $\beta$ -D-Glucan surveillance with preemptive anidulafungin for invasive candidiasis in intensive care unit patients: a randomized pilot study. *PLoS One* 2012; **7**: e42282.
- 17 Ogawa M, Hori H, Niiguchi S *et al.* False-positive plasma (1→3)- $\beta$ -D-glucan test following immunoglobulin product replacement in an adult bone marrow recipient. *Int J Hematol* 2004; **80**: 97–8.
- 18 Marty FM, Koo S. Role of (1→3)- $\beta$ -D-glucan in the diagnosis of invasive aspergillosis. *Med Mycol* 2009; **47** Suppl 1: S233–40.

- 19 Mennink-Kersten MA, Warris A, Verweij PE. 1,3- $\beta$ -D-Glucan in patients receiving intravenous amoxicillin-clavulanic acid. *N Engl J Med* 2006; **354**: 2834–5.
- 20 Racil Z, Kocmanova I, Lengerova M *et al.* Difficulties in using 1,3- $\beta$ -D-glucan as the screening test for the early diagnosis of invasive fungal infections in patients with haematological malignancies-high frequency of false-positive results and their analysis. *J Med Microbiol* 2010; **59**: 1016–22.
- 21 Nagasawa K, Yano T, Kitabayashi G *et al.* Experimental proof of contamination of blood components by (1 $\rightarrow$ 3)- $\beta$ -D-glucan caused by filtration with cellulose filters in the manufacturing process. *J Artif Organs* 2003; **6**: 49–54.
- 22 Usami M, Ohata A, Horiuchi T *et al.* Positive (1 $\rightarrow$ 3)- $\beta$ -D-glucan in blood components and release of (1 $\rightarrow$ 3)- $\beta$ -D-glucan from depth-type membrane filters for blood processing. *Transfusion* 2002; **42**: 1189–95.
- 23 Racil Z, Kocmanova I, Toskova M *et al.* Reactivity of the 1,3- $\beta$ -D-glucan assay during bacteraemia: limited evidence from a prospective study. *Mycoses* 2013; **56**: 101–4.
- 24 Eggimann P, Pittet D. *Candida* colonization index and subsequent infection in critically ill surgical patients: 20 years later. *Intensive Care Med* 2014; **40**: 1429–48.
- 25 Leon C, Ostrosky-Zeichner L, Schuster M. What's new in the clinical and diagnostic management of invasive candidiasis in critically ill patients. *Intensive Care Med* 2014; **40**: 808–19.
- 26 Bassetti M, Marchetti M, Chakrabarti A *et al.* A research agenda on the management of intra-abdominal candidiasis: results from a consensus of multinational experts. *Intensive Care Med* 2013; **39**: 2092–106.
- 27 Leroy O, Gangneux JP, Montravers P *et al.* Epidemiology, management, and risk factors for death of invasive *Candida* infections in critical care: a multicenter, prospective, observational study in France (2005–2006). *Crit Care Med* 2009; **37**: 1612–8.
- 28 Olaechea-Astigarraga PM, Alvarez-Lerma F, Palomar-Martinez M *et al.* [Trends in systemic antifungal use in critically ill patients. Multicenter observational study, 2006–2010.] *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2012; **30**: 435–40.
- 29 Valerio M, Rodriguez-Gonzalez CG, Munoz P *et al.* Evaluation of antifungal use in a tertiary care institution: antifungal stewardship urgently needed. *J Antimicrob Chemother* 2014; **69**: 1993–9.
- 30 Ruhnke M. Antifungal stewardship in invasive *Candida* infections. *Clin Microbiol Infect* 2014; **20** Suppl 6: 11–8.
- 31 Bruyere R, Quenot JP, Prin S *et al.* Empirical antifungal therapy with an echinocandin in critically-ill patients: prospective evaluation of a pragmatic *Candida* score-based strategy in one medical ICU. *BMC Infect Dis* 2014; **14**: 385.
- 32 Bassetti M, Molinari MP, Mussap M *et al.* Candidaemia in internal medicine departments: the burden of a rising problem. *Clin Microbiol Infect* 2013; **19**: E281–4.
- 33 Martinez-Jimenez MC, Munoz P, Guinea J *et al.* Potential role of *Candida albicans* germ tube antibody in the diagnosis of deep-seated candidemia. *Med Mycol* 2014; **52**: 270–5.
- 34 Ma CF, Li FQ, Shi LN *et al.* Surveillance study of species distribution, antifungal susceptibility and mortality of nosocomial candidemia in a tertiary care hospital in China. *BMC Infect Dis* 2013; **13**: 337.
- 35 Falcone M, Concia E, Iori I *et al.* Identification and management of invasive mycoses in internal medicine: a road-map for physicians. *Intern Emerg Med* 2014; **9**: 501–11.
- 36 Tortorano AM, Prigitano A, Lazzarini C *et al.* A 1-year prospective survey of candidemia in Italy and changing epidemiology over one decade. *Infection* 2013; **41**: 655–62.
- 37 Clancy CJ, Nguyen MH. Finding the “missing 50%” of invasive candidiasis: how nonculture diagnostics will improve understanding of disease spectrum and transform patient care. *Clin Infect Dis* 2013; **56**: 1284–92.
- 38 Mikulska M, Furfaro E, Viscoli C. Non-cultural methods for the diagnosis of invasive fungal disease. *Expert Rev Anti Infect Ther* 2014; **13**: 1–15.
- 39 Zaragoza R, Peman J, Quindos G *et al.* Kinetic patterns of *Candida albicans* germ tube antibody in critically ill patients: influence on mortality. *Clin Vaccine Immunol* 2009; **16**: 1527–8.
- 40 Pazos C, Moragues MD, Quindos G *et al.* Diagnostic potential of (1,3)- $\beta$ -D-glucan and anti-*Candida albicans* germ tube antibodies for the diagnosis and therapeutic monitoring of invasive candidiasis in neutropenic adult patients. *Rev Iberoam Micol* 2006; **23**: 209–15.
- 41 Lenz P, Eckelskemper F, Erichsen T *et al.* Prospective observational multicenter study to define a diagnostic algorithm for biliary candidiasis. *World J Gastroenterol* 2014; **20**: 12260–8.